

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Spann

VERGLEICHENDE MORPHIN-BESTIMMUNG MIT EMIT UND GC

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

MARINA MERK

aus

Landshut

~~1983~~
1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548306_0027

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Spann

VERGLEICHENDE MORPHIN-BESTIMMUNG MIT EMIT UND GC

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marina Merk

aus

Landshut

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. L. v. Mayer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Spann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 4. 84

Gliederung

1. Einleitung
2. Morphin und verwandte Verbindungen: Herkunft, Struktur, Metabolismus, Wirkung und Dosis
 - 2.1. Herkunft des Morphins und verwandter Alkaloide
 - 2.2. Chemische Struktur
 - 2.3. Metabolismus
 - 2.3.1. Konjugation und Ausscheidung von Morphin
 - 2.3.2. Heroinmetabolismus
 - 2.3.3. Codeinmetabolismus
 - 2.3.4. Biologische Halbwertszeit
 - 2.4. Wirkung der Opiate
 - 2.5. Therapeutische und letale Dosis
3. Nachweisverfahren für Morphin in der Literatur
 - 3.1. Nicht-gaschromatographische Verfahren
 - 3.2. Gas-Flüssigkeitschromatographie
 - 3.2.1. Funktionsprinzip
 - 3.2.2. Off-column-und On-column-Derivatisierung
 - 3.2.3. Derivatisierungsreagenzien
 - 3.2.4. Extraktionsverfahren
 - 3.2.5. Extraktionsmittel in der Literatur

- 4. Eigene Untersuchungen
 - 4.1. Gaschromatographie
 - 4.1.1. Voraussetzungen
 - 4.1.2. Derivatisierung
 - 4.1.2.1. Auswahl der Derivatisierungsreagenz
 - 4.1.2.2. Derivatbildung
 - 4.1.2.3. Einspritztemperatur
 - 4.1.3. Abgrenzung des Nachweisbereichs
 - 4.1.4. Extraktionsverfahren
 - 4.1.4.1. Extrelut^R-Säulen
 - 4.1.4.2. Extraktionsmittel
 - 4.1.4.3. Mischungsverhältnis des Elutionsmittels
 - 4.1.4.4. Zusätzliche Reinigungsverfahren
 - 4.1.4.5. Bestimmung des günstigsten pH-Wertes
 - 4.1.4.6. Endgültiges Extraktionsverfahren
 - 4.1.5. Eichkurve
 - 4.2. EMIT
 - 4.2.1. Funktionsprinzip
 - 4.2.2. Anwendungsbereich
 - 4.2.3. Eichung
 - 4.2.4. Fehlerquellen
 - 4.3. Vergleich von EMIT und GC
 - 4.3.1. Probenmenge
 - 4.3.2. Empfindlichkeit
 - 4.3.3. Präzision

4.3.4. Richtigkeit

4.3.5. Zeit-und Arbeitsaufwand

4.4. Gerätebedingungen des GC

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

1. Einleitung

Seit seiner Entdeckung als Hauptwirkstoff des Opium am Anfang des 19. Jahrhunderts spielt Morphin in doppelter Eigenschaft eine Rolle: als Pharmakon und als Rauschmittel.

Therapeutisch werden Morphin, bzw. seine Abkömmlinge, bei stärksten Schmerzen als Analgetika eingesetzt. Die Indikation muß streng gestellt und die Applikation zeitlich eng begrenzt werden, um die Gefahr der Gewöhnung und Suchtentwicklung einzuschränken.

Bei chronischer Zufuhr zwingt Morphin zu ständiger Steigerung der Dosis und führt zu physischer und psychischer Abhängigkeit. Entziehungsversuche werden durch schwerste Entzugssyndrome kompliziert und bleiben meistens erfolglos.

Die Entwicklung über Gewöhnung und Dosissteigerung zur völligen Abhängigkeit ist fast immer die Konsequenz, wenn Morphin wegen seiner euphorisierenden Wirkung als Rauschmittel mißbraucht wird. Während diese Fälle bis vor zwei Jahrzehnten noch selten waren und sich hauptsächlich auf Personenkreise beschränkten, die beruflich leicht Zugang zu Drogen hatten, brachte die Drogenwelle seither einen massiven Zuwachs an Süchtigen, der alle Bevölkerungskreise, vor allem Jugendliche, erfaßte.

Trotz optimistischer Prognosen über den Rückgang

dieser Entwicklung verzeichnen die Statistiken nur einen schwachen Abfall der Zahlen von Rauschmittel-Süchtigen und -Toten.

Von den sogenannten harten Drogen findet in erster Linie Heroin (Diacetylmorphin) als Rauschmittel Verwendung, da es aufgrund seiner hohen Lipophilie am besten die Blut-Hirn-Schranke überwindet. Die doppelte Acetylierung verleiht Heroin eine besonders hohe Suchtpotenz. Im Körper wird es über 6-Monoacetylmorphin zu Morphin metabolisiert (126,127).

Die Gefahr einer Überdosierung ist beständig gegeben, da im illegalen Handel meistens nicht reines Heroin angeboten wird, sondern vermischte Ware mit vermindertem Opiatanteil. Die enthaltene Wirkstoffmenge ist inkonstant und dem Käufer in den meisten Fällen unbekannt, so daß eine exakte Dosierung unmöglich wird.

Die Statistiken über Drogentote erfassen nicht nur diese Fälle, bei denen eine Überdosierung unmittelbar zum Tod führte, sondern auch tödliche Unfälle, die auf Rauschmitteleinfluß zurückzuführen sind. Erst die gerichtsmedizinische Untersuchung gibt Aufschluß darüber, ob ein Todesfall durch eine Überdosis verursacht wurde, oder der Drogengenuß über die Beeinträchtigung des Bewußtseins zu einem tödlichen Fehlverhalten führte.

Öfters werden Süchtige tot aufgefunden, die im Drogenrausch einschliefen und erfroren. Endgültige Klärung

über die eigentliche Todesursache bringen erst die gerichtsmedizinischen Untersuchungen. Ein wesentlicher Aspekt ist die Bestimmung der Morphinkonzentration im Blut.

Die Urinuntersuchung reicht in diesen Fällen zur Aufklärung nicht aus; die Morphinkonzentration im Urin ermöglicht - wie später noch ausführlicher erläutert wird - keine exakte Aussage über Zeitpunkt der Drogenzufuhr und Höhe der Dosis. Nur der Morphingehalt im Blut erlaubt zuverlässige Rückschlüsse.

Auch bei forensischen Fragestellungen ist die Bestimmung des Zeitpunkts der Drogeneinnahme von entscheidender Bedeutung. Drogenabhängige sind oft zu kriminellen Methoden gezwungen, um sich die Droge oder die dafür nötigen finanziellen Mittel zu verschaffen. Bei solchen Straftaten, wie auch bei allen anderen Delikten, ist es von grundlegendem Interesse, ob der Beschuldigte zum Zeitpunkt der Tat unter Drogeneinfluß stand. In diesem Fall wird ihm verminderte Verantwortlichkeit und eine Verringerung des Strafmaßes zuerkannt, oder die Strafe wird ausgesetzt, falls er sich einer Entziehungskur unterzieht.

Der Erfolg einer solchen Kur kann durch Routinekontrollen des Urins überprüft werden. Dabei ist nur die Drogenzufuhr an sich, nicht aber Dosis und Zeitpunkt von Interesse. In allen Fällen dagegen, bei denen es sich um die Schuldfrage in einem kriminellen Delikt oder die

Klärung einer unbekannten Todesursache handelt, sind Zeitpunkt der Drogeneinnahme und genaue Dosis von entscheidender Relevanz. Nur die Bestimmung der Morphinkonzentration im Blut kann hier Aufschluß geben.

Dazu ist eine zuverlässige und relativ einfach durchzuführende Methode erforderlich. Zwei mögliche Verfahren -EMIT und Gaschromatographie - sollen in dieser Arbeit auf ihre diesbezügliche Eignung hin untersucht und verglichen werden.

2. Morphin und verwandte Verbindungen: Herkunft, Struktur, Metabolismus, Wirkung und Dosis

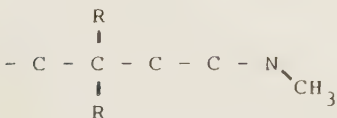
2.1. Herkunft des Morphins und verwandter Alkaloide

Morphin ist der Hauptwirkstoff des Opiums, das aus dem Saft der Mohnkapsel (*Papaver somniferum*) gewonnen wird. Außer 10% Morphin sind darin noch weitere Alkaloide enthalten. Die wichtigsten sind:

0,5% Codein, 0,8% Papaverin, 0,3% Narcein, 0,2% Thebain und 6% Narcotin.

2.2. Chemische Struktur

Morphin setzt sich zusammen aus einem Phenantrenkern und einer stickstoffhaltigen Seitenkette. Als kennzeichnende gemeinsame Grundstruktur besitzen Morphin und seine Derivate einen tertiären Stickstoff in einem Abstand von zwei Kohlenstoffatomen vom quartären Kohlenstoff:



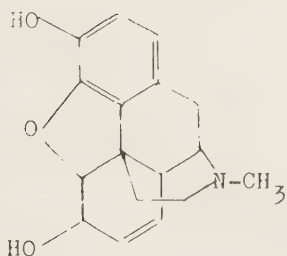
Der aromatische Rest mit der phenolischen OH-Gruppe ist für die Wirkungsstärke ausschlaggebend:

Durch Alkylierung werden analgetische und suchterzeugende Wirkungen vermindert, durch Veresterung erhöht, Acetylierung nicht nur an der phenolischen, sondern auch an der alkoholischen OH-Gruppe verstärkt die Wirkung noch weiter, was die besonders hohe Suchtgefährdung durch Diacetylmorphin (Heroin) erklärt.

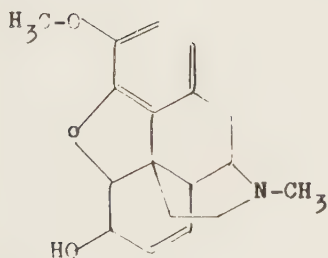
Beim Morphinantagonisten Nalorphin (N-Allylnormorphin) ist die Methylgruppe am tertiären Stickstoff durch eine Allylgruppe ersetzt.

Ebenfalls antagonistische Wirkung besitzen Levallorphan, ein dem Nalorphin analoges Allylderivat des Levorphanols, und Naloxon (N-Allyloxymorphin).

Durch Erhitzen in anorganischen Säuren auf $140 - 150^{\circ}\text{C}$ wird aus Morphin Apomorphin gewonnen, das durch seine unmittelbare Wirkung auf das Brechzentrum im Gehirn einen emetischen Effekt besitzt.

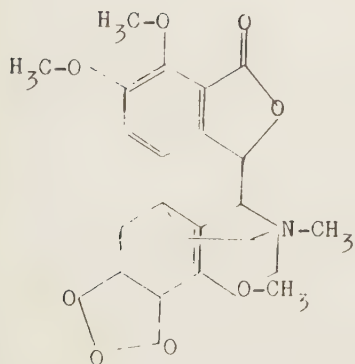


Morphin



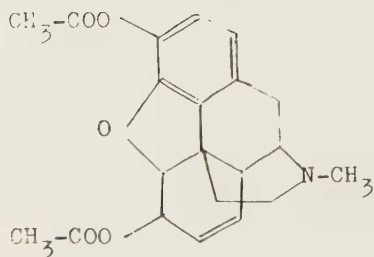
Codein

(Methylmorphin)

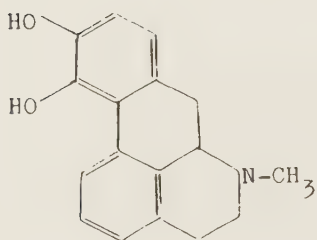


Narcotin

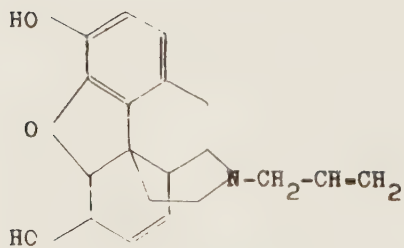
(Noscapin)



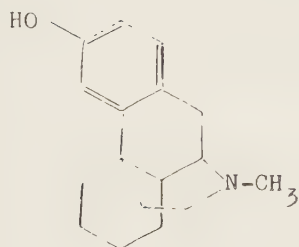
Heroin
(Diacetylmorphin)



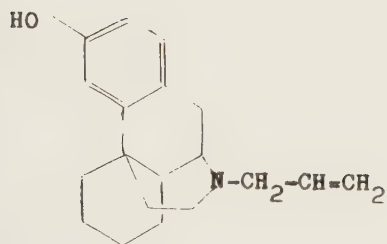
Apomorphin



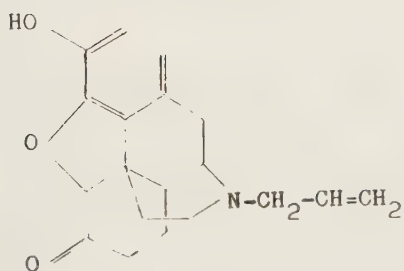
Nalorphin
(N-Allylnormorphin)



Levorphanol
(3-Hydroxy-N-methyl-
morphinan)



Levallorphan
(3-Hydroxy-N-allyl-
morphinan)



Naloxon
(N-Allyloxymorphan)

2.3. Metabolismus

2.3.1. Konjugation und Ausscheidung von Morphin

Morphin wird als basisches Amin schnell aus dem Blut umverteilt in die Gewebe: in Leber, Nieren, Lunge, Milz und Muskulatur (67,132). Am stärksten ist die Leber betroffen (96). Tierversuche von Mellet und Woods zeigten, daß nur geringe Mengen die Blut-Hirn-Schranke durchdringen (Mellet L.B. und Woods L.A., 67, Woods L.A., 132). Dieses Ergebnis wurde von Oldendorff und Mitarbeitern bestätigt (Oldendorff W.H. e.a.,82).

40 - 50% des resorbierten Morphins wird von der Niere ausgeschieden, der größte Teil davon in konjugierter Form als Morphin-3-glucuronid (41), als freies Morphin oder in N-demethylierter Form (136). Nur ein geringfügiger Teil gelang in den Faeces zur Ausscheidung (10).

Bei der renalen Clearance von freiem und konjugiertem Morphin spielt der pH eine entscheidende Rolle (70).

50% des Morphins wird während der ersten acht Stunden renal ausgeschieden, 90% während der ersten 24 Stunden (126).

Bis zu 48 Stunden nach Aufnahme der Droge können Spuren davon im Urin nachgewiesen werden (125).

Allerdings unterliegt die Anhäufung von Morphin im Urin ebenso wie die Anreicherung in der Leber keiner exakten

Gesetzmäßigkeit. Die Werte nach Einnahme der gleichen Dosis schwanken von Person zu Person stark und divergieren sogar bei dem selben Individuum von einer Einnahme zur nächsten (35).

Die Blutkonzentration ist daher ein genauerer Parameter, der auf die tatsächlich zugeführte Drogenmenge schließen läßt.

3.2. Heroinmetabolismus

Diacetylmorphin wird kurz nach der Injektion - nach einer Halbwertszeit von 8 Minuten bei Hunden und 2,5 Min. bei Mäusen (120,121) - zu 6-Monoacetylmorphin deacetyliert und dann weiter in Morphin umgewandelt (127,128). Von da an entsprechen Umverteilung und Ausscheidung dem Morphinmetabolismus.

3.3. Codeinmetabolismus

Codein wird im menschlichen Körper zu Norcodein N-demethyliert (3), das bezüglich der Wirkungsintensität dem Codein noch gleichwertig ist (40). Durch O-Demethylierung wird es in Morphin umgewandelt, das in der Wirkung um ein Vielfaches überlegen ist (104,126). Umgekehrt können auch

geringe Mengen von Morphin in Codein überführt werden (33).

Die These der Umwandlung von Morphin in Codein ist jedoch nicht absolut gesichert und wird von manchen Autoren nur als Resultat einer artefiziellen Verunreinigung bei den Untersuchungen angesehen.

Neben 10% unverändertem Codein konnte Parke (84) 40% konjugiertes Codein, 10% Norcodein und 10% Morphin nachweisen.

Der Nachweis von Morphin im Urin nach Codeineinnahme gelang in manchen Fällen 48 Std. danach (111), bei anderen Untersuchungen dagegen frühestens nach 72 Stunden (52). Auch diese Divergenzen kennzeichnen die Notwendigkeit eines exakten Nachweises aus dem Blut.

2.3.4. Biologische Halbwertszeit

Morphin kann oral oder parenteral verabreicht werden, wobei die Wirkung nach oraler Einnahme deutlich schwächer ist.

Nach Untersuchungen von Brunk und Delle (18) wirkt Morphin nach intravenöser Gabe am schnellsten, wird aber auch schneller umverteilt und ausgeschieden als nach intramuskulärer und subkutaner Gabe.

Die höchsten Anfangswerte erreicht die Plasmakonzentration an freiem Morphin nach i.v. Injektion. Sie fällt dann jedoch schneller ab als nach subkutaner oder intramuskulä-

rer Injektion: im Zeitraum von 15 Min. bis 3 Std. p.i. liegt die Plasmakonzentration nach i.v. Gabe unterhalb des Wertes, der sich nach subkutaner und intramuskulärer Anwendung einstellt.

Die biologische Halbwertszeit von freiem Morphin beträgt in allen Fällen zwischen 2,1 und 2,6 Std., die Abnahme folgt einer Exponentialkurve (18,27).

Für konjugiertes Morphin liegt der Plasmaspiegel bis 30 Min. p.i. ebenfalls nach i.v. Injektion am höchsten. Nach 1 Std. stellt sich für alle parenteralen Anwendungsmodi die gleiche Plasmakonzentration ein. Nach 2 bis 3 Std. fällt sie dann ab auf Werte, die unterhalb des Spiegels liegen, der sich im gleichen Zeitraum nach oraler Gabe einstellt.

Bei konjugiertem Morphin erfolgt die Abnahme im Blut im Gegensatz zu freiem Morphin nicht exponentiell (18).

Ausschlaggebend für die pharmakologische Wirkung ist das freie Morphin. Da seine Abnahme aber anderen Gesetzen folgt wie das an Glucuronsäure gekoppelte Morphin, kann nur die Bestimmung des Gesamtmorphins im Blut genauen Aufschluß über die Dosis geben.

2.4. Wirkung des Morphins

Durch die Hemmung der nozizeptiven Afferenzen zum limbischen System wirkt Morphin stark analgetisch (60). Der Effekt beruht weniger auf einer gedämpften Schmerzempfindung als auf

der Minderung der affektiven Schmerzreaktion. Opiate sind die stärksten bekannten Analgetika und werden in dieser Eigenschaft therapeutisch eingesetzt.

Nach einer sehr kurz dauernden Anregung ruft Morphin ein intensives Schlafbedürfnis hervor, dämpft die geistige Aktivität und führt in höheren Dosen zu Bewußtlosigkeit. Der Vagusnerv wird erregt. Daraus resultieren Bradykardie und die charakteristische Miosis.

Der Tonus der glatten Muskulatur wird gesteigert, z.B. am Magenausgang oder im Intestinaltrakt. Dieser Effekt wird therapeutisch nicht mehr genutzt, da er leicht zu Spasmen führt.

Am zentralen Nervensystem wird das Brechzentrum erregt, Atem- und Hustenzentrum werden gehemmt. Die Hemmung des Atemzentrums ist von entscheidender Bedeutung: höhere Dosen führen zu vollständiger Atemlähmung und damit zum Tod.

Maßgebend für den Mißbrauch als Rauschmittel ist der euphorisierende Nebeneffekt. Obwohl es gelegentlich auch zu Dysphorie und Unruhe kommen kann, wird im allgemeinen die Stimmung stark aufgehellt, Angstgefühle werden beseitigt und halluzinatorische Traumbilder hervorgerufen.

Wiederholte Morphinzufuhr kann zu psychischer und physischer Abhängigkeit führen. Schnelle Gewöhnung zwingt den Drogenabhängigen die Dosis ständig zu steigern, um die euphorisierende Wirkung zu erzielen.

Nach erzwungenem Absetzen der Drogenzufuhr entwickeln sich schwere Entziehungssymptome wie Schwäche, Schwitzen, Diarrhoe, Kreislaufversagen, Erbrechen, die von stärksten psychischen Störungen wie Unruhe, Angstzuständen und Depressionen begleitet sind.

2.5. Therapeutische und letale Dosis

Die normale therapeutische Dosis für Morphin liegt bei 0,01 g pro Erwachsenen. Sie kann sich bei extremer Gewöhnung bis zum 100fachen steigern (48).

Bei tödlichen Zwischenfällen nach Drogenmißbrauch wurden Konzentrationen zwischen 0,2 und 2,8 µg Morphin pro Gramm Blut festgestellt. Die niedrigen Konzentrationen traten nur bei Personen auf, die noch keine ausgeprägte Gewöhnung entwickelt hatten (35,42,95,96).

Die individuell letale Dosis schwankt jedoch beträchtlich. Sie ist abhängig von der augenblicklichen körperlichen Verfassung des Süchtigen, mehr aber noch vom Grad seiner Gewöhnung (6,49,56).

Codein wird normalerweise in Mengen von 0,03 bis 0,05 g pro Erwachsenen als Antitussivum therapeutisch eingesetzt.

Nach Todesfällen wurden zwischen 3,5 und 4,8 µl Codein pro ml Blut nachgewiesen (88).

Wegen seiner dämpfenden Wirkung auf das Hustenzentrum im Gehirn ist Codein häufig in Hustensäften enthalten. Eine entsprechend hohe Überdosierung von Hustensirup kann daher letal enden (131).

Tödliche Codeinintoxikationen nach oraler Applikation sind allerdings sehr selten (87,106). Dagegen kann es nach intravenöser Injektion durch Opiatsüchtige leichter zu Überdosierung kommen. (88,134).

3. Nachweisverfahren für Morphin in der Literatur

3.1. Nicht-gaschromatographische Verfahren

Die wichtigsten in der Literatur beschriebenen Verfahren, die nicht gaschromatographisch arbeiten und auf die daher nicht näher eingegangen werden soll, seien nur kurz angeführt:

Spectrofluorometrie (46,59,75,94,99,119)

Infrarot-Absorptionsspectrophotometrie (26,93)

Ultraviolett-Absorptionsspectrophotometrie (76)

CI (Chemical Ionisation) - Massenspektroskopie (98)

EI (Electron Impact)- Massenspektroskopie (77)

Hämagglutinationshemmung (1,2,20,110)

FRAT (Free Radical Assay) (7,61,62)

RIA (Radio Immuno Assay) (8,21,25,45,47,89,92,113,114,138)

Dünnschichtchromatographie (30,51,64,73,109,115,122,132)

Hochdruckflüssigchromatographie (19,22,55,83,112,120,121,
129,135,139)

Das EMIT-Verfahren wird weiter unten noch eingehender beschrieben. (16,80,97,103,107)

GC/MS ist eine Kombination von Gaschromatographie und

Massenspectrophotometrie, muß aber als eigenständiges Verfahren gewertet werden. (11,32,37,98)

3.2. Gaschromatographie

3.2.1. Funktionsprinzip

Chromatographische Trennverfahren basieren auf den unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten von Substanzen zwischen zwei verschiedenen Phasen. Eine mobile Phase, die das Substanzgemisch enthält, bewegt sich über eine stationäre Phase.

Bei der Gaschromatographie befindet sich die stationäre Phase in einer Säule, die von einem Trägergas - der mobilen Phase - durchströmt wird.

Die untersuchte Substanz verteilt sich gemäß ihrer Löslichkeit zwischen stationärer Phase und Trägergas. Die Affinität zur stationären Phase wird zusätzlich durch den Dampfdruck der untersuchten Substanz mitbestimmt: bei höherem Dampfdruck befindet sich ein größerer Teil der Substanz in der Gasphase.

Das Substanzgemisch wird mit einer Spritze in den Säulenkopf injiziert. Nach einer genau zu bestimmenden Zeitdifferenz, die von dem Verteilungskoeffizienten und den Gerätebedingungen abhängt, verläßt jede Substanz getrennt

die Säule. Diese Zeitdifferenz ist für jede Substanz charakteristisch und ermöglicht ihre Identifikation.

Ein Detektor am Ende einer Säule registriert den Zeitpunkt, zu dem die Substanz die Säule verläßt und mißt zugleich die Konzentration.

3.2.2. Off-column- und On-column-Methoden

Bei der Anwendung der Gaschromatographie zur Bestimmung phenolischer Alkaloide, wie des Morphins und seiner Verwandten, stellte sich heraus, daß die Verwendung der freien Basen (13,54,116) zwar zur qualitativen, nicht aber zur quantitativen Analyse geeignet war.

Die Schwierigkeit liegt in der Polarität der phenolischen Alkaloide. Sie führt zu Adsorption in der Säule und damit zu nicht linearen, nicht reproduzierbaren quantitativen Ergebnissen im Bereich niedriger Konzentrationen (14,66).

Dieser Nachteil wird umgangen, wenn das Alkaloid in ein unpolares Derivat überführt wird.

Hierzu gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

Bei der Off-column-Methode wird das Morphin noch vor dem Einspritzen in die Säule in das entsprechende Derivat überführt. Dazu sind einige Stunden zur Umsetzung nötig (96), teilweise auch längeres Erhitzen im Wasserbad (29, 105,108,123), bei einigen Acetylderivaten 24-stündiges

Erhitzen (137).

Anders und Mannering beschreiben die On-column-Methode, bei der das extrahierte Alkaloid zusammen mit dem Derivatisierungsreagenz in einer Spritze aufgezogen und in die Säule injiziert wird. Das entsprechende Derivat bildet sich hierbei erst in der Säule (4,5).

Während die Off-column-Methode schon immer für quantitative Bestimmungen eingesetzt wurde, wandte man die On-column-Methode anfangs nur für qualitative Analysen an (63,90).

Brugaard und Rasmussen wiesen nach, daß auch nach Derivatbildung in der Säule zuverlässige quantitative Angaben möglich sind. (Brugaard G. und Rasmussen K.E., 17, Rasmussen K.E., 80).

3.2.3. Derivatisierungsreagenzien

Als mögliche Derivate haben sich bisher Methyl-, Acetyl-, Propionyl-, Butyryl- und Silylderivate bewährt.

Brochmann-Hanssen und Oke methylierten Morphin mit Trimethylanilin zu Codein (Brochmann-Hanssen E. und Oke T.O., 15).

Mit Acetanhydrid, teilweise in Verbindung mit Pyridin, wird Morphin zu Diacetylmorphin (Heroin) umgesetzt (5,24,73,123)

Eine weitere Möglichkeit zur Acetylierung bietet

Trifluoracetanhydrid (108,124,137).

Das Propionylderivat bildet sich entweder mit Hilfe von Propionsäureanhydrid (24,105) oder mit dem entsprechenden fluorierten Derivat (28,29,36).

Mit Butyrylsäureanhydrid (105) oder mit Heptafluorpropionsäureanhydrid =HFBA (9) wird Morphin zum Butyrylderivat acyliert.

Während sich vor allem halogenierte Derivate zur Bestimmung mit hochempfindlichen Elektronen-Einfang-Detektoren eignen, haben sich Trimethylsilylderivate auch für die unkomplizierten Flammen-Ionisations-Detektoren (FID) bewährt (53,102,116).

Folgende Derivatisierungsreagenzien finden bei der Silylierung Verwendung:

das von Klebe e.a. (57) beschriebene N,O-Bis-trimethylsilylacetamid = BSA (35,78,85,117),

das von Zumwalt e.a. (140) beschriebene Bis-trimethylsilyl-2,2,2, trifluoracetamid = BSTFA (53,85,130),

der von Martin und Swinehart (66) beschriebene Trimethylsilyläther = TMS (34,39,96,130),

und BSTFA zusammen mit Trimethylchlorosilan, wie es von Yeh angewandt wurde (Yeh S.Y., 137).

Speziell bei der On-column-Methode berichten Brugaard und Rasmussen gute Ergebnisse mit entsprechenden Imidazolen als Derivatisierungsreagenzien. Sie arbeiten mit

Heptafluorbutyrylimidazol = HFBI, Trifluoracetylimidazol = TFAI und Trimethylsilylimidazol. (Brugaard G. und Rasmussen K.E., 17, Rasmussen K.E., 90)

3.2.4. Extraktionsverfahren

Der Morphinnachweis in illegal gehandelten Drogen kann ohne schwierige Vorarbeit vorgenommen werden (31,48,72,77).

Bei der Morphinbestimmung aus biologischem Material ist eine vorausgehende Extraktion notwendig. Die besondere Schwierigkeit liegt darin, das Morphin ohne relevante Verluste und mit einem absoluten Minimum an störenden Begleitsubstanzen zu extrahieren.

Für die Extraktion aus Blut werden mehrere Methoden empfohlen. Sie unterscheiden sich zum Teil erheblich hinsichtlich eingesetzter Blutmenge, Morphinausbeute und Arbeitsaufwand. Christopoulos und Kirch benötigen für ihr Verfahren die extrem große Probenmenge von 250 ml Blut, wodurch die praktische Anwendbarkeit stark eingeschränkt wird (Christopoulos und Kirch, 23).

Von Robinson und Williams (96) wird ein Verfahren beschrieben, das von Felby, Christensen und Lund (35) leicht abgewandelt übernommen wurde:

Die eingesetzte Blutmenge beträgt hier 10 ml. Als interner Standard wird Nalorphin zugegeben.

Vor der eigentlichen Extraktion wird das Blut hydrolysiert. Die Hydrolyse erfolgt nach Zugabe von Salzsäure durch 30minütiges Erhitzen im Wasserbad. Die Säure wird mit Natriumhydroxidlösung neutralisiert und der pH auf 8,3 bis 8,4 eingestellt. Diese Mischung wird 20 Min. lang mit Dichloräthan und Isobutanol im Verhältnis 3 : 1 ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die flüssige Schicht wird durch Phasentrennpapier gefiltert und durch 20 minütiges Ausschütteln mit 10 ml 1 N Schwefelsäure extrahiert.

Der saure Extrakt wird abgetrennt und mit 1,5 ml 40%iger Natriumhydroxidlösung neutralisiert. Der pH wird mit festem Natriumbicarbonat wieder auf 8,3 bis 8,4 eingestellt.

Das Ausschütteln mit Dichloräthan und Isobutanol und das Filtrieren der organischen Phase durch Phasentrennpapier werden wiederholt. Der Extrakt wird im kochenden Wasserbad zum Verdampfen gebracht und der Rückstand 2 Std. unter Vakuum getrocknet. Mit einer Lösung von Bis-trimethylsilyl-acetamid wird derivatisiert. Nach 2 Std. kann das gebildete Derivat in einen Gaschromatographen mit FID eingespritzt werden.

Nach Angabe der Autoren liegt bei dieser Methode die Ausbeute an Morphin bei $91 \pm 4,4\%$, an Nalorphin bei $83 \pm 3,6\%$, die Nachweisgrenze bei $0,1 \mu\text{g pro ml Blut}$.

Andere Autoren (38,44,78,86) kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß nach vorausgehender Hydrolyse die Morphinaus-

beute größer ist. Durch die Hydrolyse wird das konjugierte Morphin von der Glucuronsäure wieder abgespalten und so zu freiem Morphin zurückverwandelt. Damit wird das Problem umgangen, daß mit den meisten Verfahren nur das freie Morphin bestimmt werden kann. Durch die Beschränkung auf das freie Morphin wird sowohl die Ausbeute maßgeblich verringert als auch das Ergebnis leicht verfälscht, da freies und konjugiertes Morphin bei der Ausscheidung verschiedenen Gesetzmäßigkeiten folgen.

Wallace, Biggs und Blum (123) beschreiben ein Verfahren ohne vorhergehende Hydrolyse:

10 ml Probenblut werden eingesetzt. Nach Sättigung mit Natriumbicarbonat wird 3 bis 5 Minuten mit einer Isobutanol/Chloroform-Mischung im Verhältnis 1 : 9 extrahiert.

Die Lösung wird filtriert und in einem geeichten Meßzylinder gemessen, um Verluste durch die Filtration auszugleichen. Nach Rückextraktion in 10 ml 0,5 N Salzsäure wird die saure wäßrige Phase mit Kaliumcarbonat auf pH 9,0 bis 9,5 eingestellt.

Der erhaltene Extrakt wird 5 Minuten mit einer Chloroform/Butanol-Mischung ausgeschüttelt; die organische Phase wird abgetrennt und mit 5 ml 2,0 M Natriumcarbonatlösung ausgewaschen. Die organische Phase wird insgesamt dreimal ausgewaschen, schließlich erneut gefiltert und dann eingeeengt. Unter 1stündigem Erhitzen wird das extrahierte Morphin mit Acetanhydrid und Pyridin acetyliert. Nach Zugabe von Metha-

nol wird nochmals eingedampft und der Rückstand in Butylacetat gelöst.

Zusammen mit dem internen Standard wird diese Lösung in einen GC mit FID eingespritzt.

Für die erzielte Morphinausbeute geben die Autoren einen Durchschnittswert von 76,4 % für die Extraktion aus Lebermaterial an, die analog der Extraktion aus Blut durchgeführt wird.

Als Nachweisgrenze nennen sie 0,1 µg/ml.

Dahlström, Paalzow und Edlund (29) benötigen für den Nachweis 0,05 bis 1 ml Plasma. 3-Acetylmorphin als interner Standard wird der Probe unmittelbar zugefügt.

Mit 1,5 M Carbonatpuffer wird der pH auf 8,9 eingestellt. Nach Zugabe von 3 ml eines Toluol/Butanol- Gemisches im Verhältnis 9 : 1 wird die Probe 30 Min. geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die organische Phase wird mit 0,5 ml 0,1 M Schwefelsäure 15 Min. ausgeschüttelt.

Nun wird die organische Phase verworfen und die saure wäßrige Phase noch einmal mit 3 ml der Toluol-Butanol-Mischung ausgeschüttelt. Wieder folgt Zentrifugieren und Verwerfen der organischen Phase. Die wäßrige Phase wird mit Carbonatpuffer auf pH 8,9 gebracht.

Erneut wird mit 3 ml Toluol/Butanol ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die organische Phase wird in silanisierte Reagenzgläser übertragen und eingedampft.

Mit 100 µl Pentafluorpropionsäure bildet sich unter

30-minütigem Erhitzen das Propionylmorphin. Nach nochmaligem Einengen wird der trockene Rückstand in 75 bis 100 µl Äthylacetat gelöst.

Nach Angabe der Autoren liegt die Morphinausbeute bei diesem Extraktionsverfahren bei $67 \pm 4\%$, die Empfindlichkeit bei 7,5 ng pro Probe.

Die für diese Methode erforderliche Blutmenge ist sehr gering. Die absolute Ausbeute an Morphin ist deshalb aber nicht mehr ausreichend, um mit einem Flammenionisationsdetektor erfaßt zu werden. Ein Elektronen-Einfang-Detektor wird erforderlich. Dasselbe gilt für ähnliche Extraktionsmethoden, die zwar mit einer geringen Probenmenge auskommen, dafür aber den aufwendigeren Detektor-Typ benötigen (36,43,58,71).

Smith dagegen gelingt der Nachweis auch mit dem relativ unkomplizierten Stickstoff-Detektor (108).

3.2.5. Extraktionsmittel in der Literatur

Bei jedem Extraktionsverfahren kommt dem Extraktionsmittel eine entscheidende Funktion zu. Um eine optimale Ausbeute an Morphin zu ermöglichen, muß das Lösungsmittel die Adsorption des als freie Base vorliegenden Alkaloids an der Wand der Extraktionsgefäße weitestgehend verhindern. Darüber hinaus muß es die Verunreinigung durch mit-extrahierte Substanzen so weit wie möglich einschränken.

In der Literatur werden folgende Lösungsmittel als geeignet beschrieben:

Toluol/Butanol im Verhältnis 9 : 1 für Morphin und Codein (28,29)

Chloroform/Isobutanol 4 : 1 für Morphin (23,123)

Chloroform/Isopropanol 3 : 1 für Morphin (35)

Äthylacetat/Isobutanol 9 : 1 für Morphin und Codein (78)

Dichloräthan/Isobutanol 3 : 1 für Morphin (96)

Butylchlorid für Codein (141)

Benzol für Morphin (108,126)

Äthylacetat für Morphin (36)

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Gaschromatographie

4.1.1. Voraussetzungen

In eigenen Untersuchungen sollten zwei Verfahren zur quantitativen Morphinbestimmung im Blut verglichen werden: EMIT und Gas-Flüssigkeitschromatographie.

Die Kriterien waren Präzision, Empfindlichkeit und Richtigkeit.

Bei EMIT und Gaschromatographie handelt es sich um Verfahren, die in jedem Laboratorium problemlos durchgeführt werden können, und damit für Routinekontrollen einsetzbar sind. Die Details für EMIT wurden in einer vorausgehenden Arbeit behandelt. (117)

Für die Gaschromatographie sollte ein Extraktionsverfahren entwickelt werden, das für routinemäßige praktische Anwendung geeignet ist. Dazu muß es folgende Bedingungen erfüllen:

- die eingesetzte Probenmenge soll möglichst gering sein, da häufig nur sehr wenig Blut zur Verfügung steht;
- der Arbeits- und Zeitaufwand soll nicht wesentlich über dem Aufwand liegen, den andere als chromatographische Bestimmungen erfordern. Dadurch werden gleichzeitig die

Kosten eingeschränkt.

- um die Anwendung nicht auf speziell ausgerüstete Laboratorien zu beschränken, sollen einfachere Detektoren zur exakten Bestimmung ausreichen;
- die Nachweisgrenzen müssen einen möglichst weiten Bereich umfassen.

4.1.2. Derivatisierung

1.2.1. Auswahl des Derivatisierungsreagenz

Als Derivatisierungsreagenzien wurden Propionsäureanhydrid = PSA (68) und Heptafluorbutyrylimidazol = HFBI verglichen.

Beide Substanzen wurden unverdünnt eingesetzt.

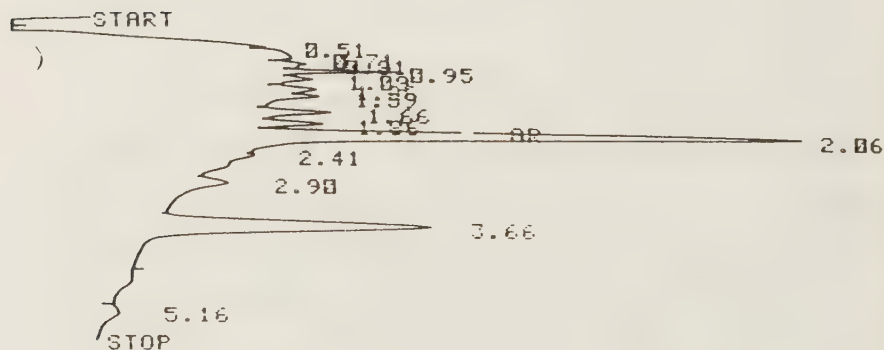
Probeweise wurden wäßrige Morphin- und Nalorphinlösungen mit H_2CO_3 auf pH 8,5 oder mit Ammoniakpuffer auf pH 9,5 gepuffert und extrahiert. 100 μl PSA wurden teilweise vor und teilweise nach der Extraktion zugegeben.

Im nächsten Versuch wurde 1 μl Morphin- bzw. Nalorphinlösung direkt zusammen mit 1 μl PSA in die Spritze aufgezogen. Der gleiche Versuch wurde analog mit HFBI wiederholt.

Verschiedene Konzentrationen von Morphinbase wurden zusammen mit PSA oder HFBI eingedampft und der Rückstand in Äthylacetat gelöst.

Für einen weiteren Test wurden 5 ml wäßrige Natriumhydroxidlösung mit 5 ml Äthylacetat und 100 µl des Derivatisierungsreagenz ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde verworfen und der Rest eingengt. 10 bzw. 100 µl Morphinbase wurden zugefügt und ebenfalls eingedampft. Der Rückstand wurde in Äthylacetat gelöst.

Mit HFBI kamen in keinem Fall für den stickstoffempfindlichen Detektor verwertbare Peaks im Gaschromatogramm zustande. Mit PSA ergaben sich zwei deutliche Peaks für Monopropionyl- und Dipropionylmorphin. Das zeitliche Auftreten des Nalorphinpeaks ließ sich ebenfalls festlegen.



Gaschromatogramm von 1 µl Morphinbase, mit 1 µl reinem PSA zusammen eingespritzt:

deutliche Aufteilung in zwei Derivate: Monopropionylmorphin bei 2.06 Min., Dipropionylmorphin bei 3.66 Min.

1.2.2. Derivatbildung

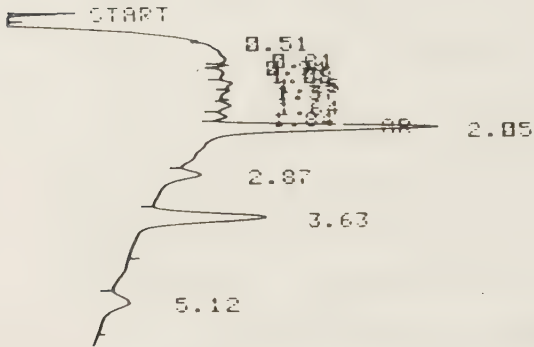
Für die Berechnung der Konzentration ist die Aufspaltung in zwei Derivate, das Mono- und das Dipropionylmorphin, nachteilig. Um eine Verschiebung der Derivatbildung zugunsten eines der beiden Derivate zu erzielen, wurden niedrigere Konzentrationen von PSA erprobt.

PSA wurde in Äthylacetat gelöst und Lösungen mit einem PSA-Gehalt von 50%, 10%, 5% und 2% hergestellt. Jeweils 1 µl dieser Lösungen wurde zusammen mit 1 µl der Lösung von Morphinbase in Äthylacetat eingespritzt.

Proportional zur Abnahme der PSA-Konzentration nimmt der Anteil des Dipropionylderivates ab und der des Mono-propionylderivates zu. Mit dem 2%igen PSA beträgt das Verhältnis vom Mono- zum Dipropionylderivat etwa 99 : 1. Das Dipropionylderivat kann deshalb in der Auswertung vernachlässigt werden.

Die niedrige PSA-Konzentration in der 2%igen Lösung reicht aus, um das Morphin in das entsprechende Derivat überzuführen. Die Acylierung gelingt auch bei dieser Konzentration noch vollständig.

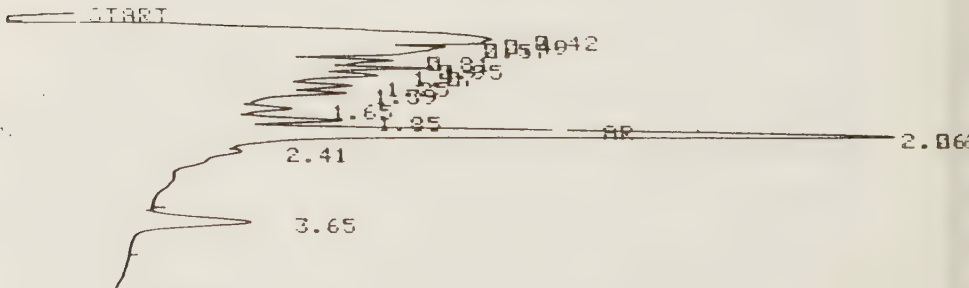
Verschiebung des Verhältnisses von Mono- zu Dipropionylmorphin durch Änderung der PSA-Konzentration:



PSA 100%ig;

Monopropionylmorphin bei 2.05 Min.

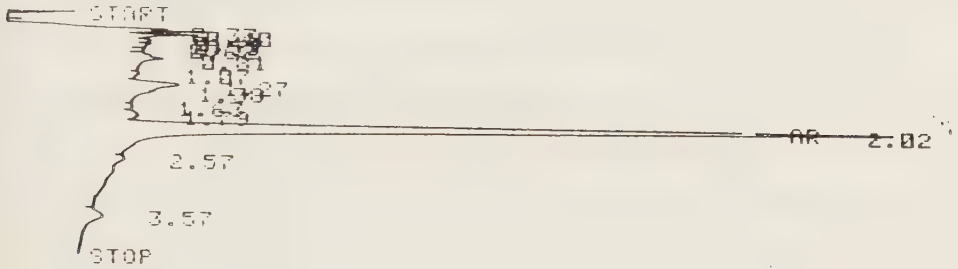
Dipropionylmorphin bei 3.63 Min.



PSA 10%ig;

Monopropionylmorphin bei 2.06 Min.

Dipropionylmorphin bei 3.65 Min.

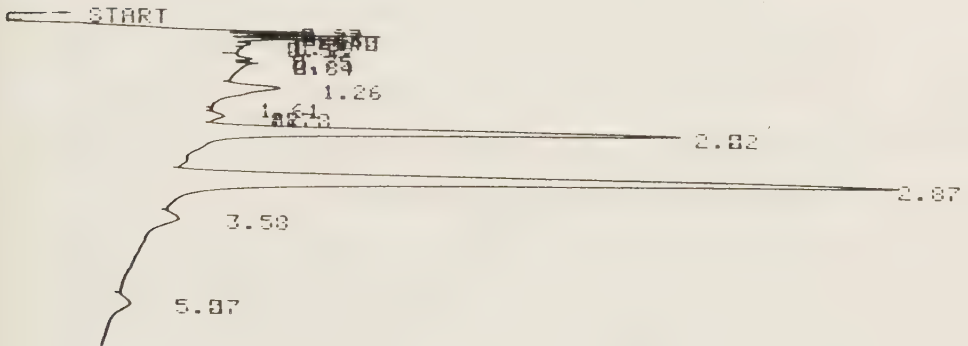


PSA 5%ig;

Monopropionylmorphin bei 2.02 Min.

Dipropionylmorphin bei 3.57 Min.

Das Verhältnis der Nalorphinderivate verschiebt sich analog den Morphinderivaten:



PSA 5%ig;

Monopropionylmorphin bei 2.02 Min.

Dipropionylmorphin bei 3.58 Min.

Monopropionynnalorphin bei 2.87 Min.

Dipropionynnalorphin bei 5.07 Min.

Eine weitere Vereinfachung des Derivatisierungsverfahrens besteht darin, die eingeengte extrahierte Substanz statt in einem unpolaren Lösungsmittel direkt in der 2%igen PSA-Lösung aufzulösen und davon 1 μ l in den GC einzuspritzen. Die On-column-Umsetzung des Morphins in sein Mono-Derivat erfolgt dabei vollständig und ohne Beeinträchtigung von Ausbeute und Peakform.

.1.2.3. Einspritztemperatur

Da die Derivatbildung bei der On-column-Methode erst in der Säule stattfindet, ist die Einspritztemperatur für die Vollständigkeit der Reaktion ausschlaggebend.

In Versuchsreihen wurden verschiedene Einspritztemperaturen hinsichtlich der erzielten Ausbeute verglichen:

1 μ l, 10 μ l und 100 μ l Morphinbase wurden jeweils eingedampft und in 50 μ l 2%igem PSA gelöst.

Zusätzlich wurden Probelösungen hergestellt, indem die Morphinbase zusammen mit reinem PSA eingedampft und in Äthylacetat gelöst wurde. Ein analoger Versuch wurde mit HFBI durchgeführt.

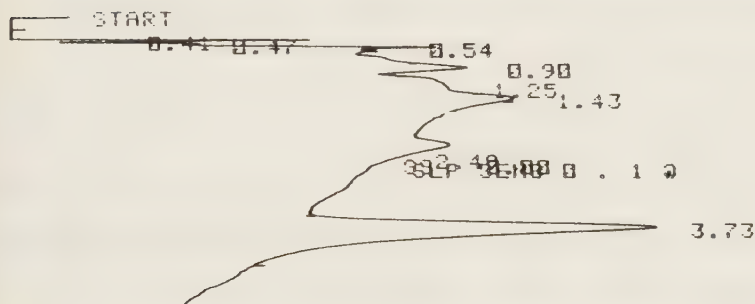
Die Einspritztemperatur wurde in Schritten von 10°C von 230°C bis 300°C erhöht.

Bei jeder Temperaturstufe wurden sämtliche vorbereiteten Proben eingespritzt.

Es zeigte sich, daß auch bei veränderten Temperaturen mit HFBI keine befriedigende Derivatbildung erfolgt.

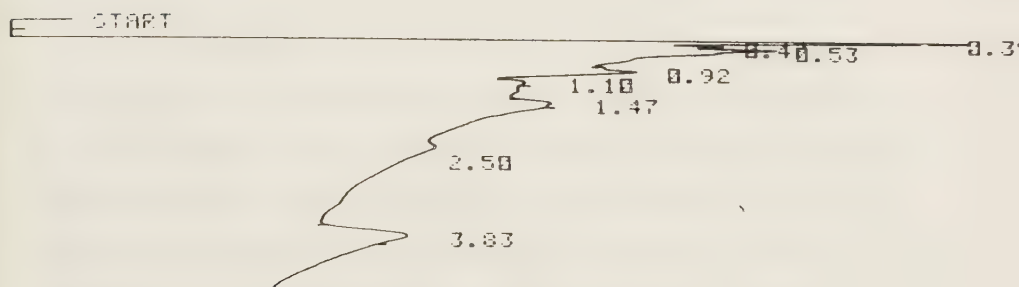
Mit PSA als Derivatisierungsreagenz verbesserte sich die Morphinausbeute mit steigender Temperatur. Die optimale Einspritztemperatur liegt somit bei 300°C.

Morphinausbeute bei verschiedenen Einspritztemperaturen:



Einspritztemperatur 300°C

Morphinpeaks bei 2.48 Min. und 3.73 Min.



Einspritztemperatur 250°C

Morphinpeaks bei 2.50 Min. und 3.83 Min.

4.1.3. Abgrenzung des Nachweisbereichs

In zwei Versuchsreihen mit sehr geringen und sehr hohen Morphinkonzentrationen sollte der Konzentrationsbereich festgestellt werden, in dem die Abhängigkeit der Peakhöhen von der injizierten Morphinmenge noch einer linearen Beziehung folgt.

Dazu wurde für jede Probe die entsprechende Morphin- und Nalorphinmenge in 5 ml Puffer 9,5 gelöst und mit 5 ml Ätheräthylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingengt, und der trockene Rückstand in 5%igem PSA gelöst. 1 µl dieser Lösung wurde in den GC eingespritzt.

1 µl injizierter Lösung enthielt bei der Reihe mit niedrigen Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,2 ng Morphin und als Standard 0,2 ng Nalorphin, bei der Reihe mit hohen Konzentrationen zwischen 10 und 200 ng Morphin und 100 ng Nalorphin.

Die Peakhöhen verhielten sich bei hohen und niedrigen Konzentrationen in etwa proportional der eingespritzten Morphinmenge. Bei den Morphinmengen unter 0,3 ng waren die Peaks allerdings zu klein, um zuverlässige quantitative Angaben zu ermöglichen. In diesem Konzentrationsbereich läßt sich nur registrieren, daß mit höchster Wahrscheinlichkeit in der untersuchten Probe Morphin vorliegt.

Bei dem später angewandten endgültigen Extraktionsverfahren

entspricht die Konzentration von 0,3 ng pro μ l injizierter Lösung einer Blutkonzentration von 7,5 ng/ml. Durch Verluste während der Extraktion verschiebt sich diese Nachweisgrenze nach oben. Auch Irrtümer durch Verschmutzung oder Verschleppung der vorausgehenden Probe können erst bei einer etwas höheren Konzentration ausgeschlossen werden. Quantitativ zuverlässige Angaben sind ab Blutkonzentrationen von 30 bis 50 ng/ml möglich.

4.1.4. Extraktionsverfahren

1.4.1. Extrelut-Säulen

Die Extraktion aus dem Blut erfordert ein einfach durchzuführendes Verfahren, das gute Reproduzierbarkeit und hohe Ausbeute garantiert. Hinsichtlich dieser Forderungen hat sich die Extraktion über Extrelut^R-Säulen bewährt (69,12).

Die Blutprobe wird mit Pufferlösung auf den richtigen pH eingestellt und gleichzeitig auf die Menge von 20 ml ergänzt. Das gepufferte Blut wird auf die Extrelut^R-Säule gegeben und nach 30 minütiger Einwirkzeit mit dem Lösungsmittel ausgewaschen.

4.1.4.2. Extraktionsmittel

Von grundlegender Bedeutung bei der Extraktion ist das Extraktionsmittel. Es muß die Adsorption des Morphins an der Wand weitestgehend verhindern, um eine maximale Ausbeute zu gewährleisten. Die Extraktion soll möglichst spezifisch verlaufen, um Störsubstanzen zu eliminieren. Nach diesen Kriterien wurden mehrere mögliche Lösungsmittel getestet.

Im ersten Versuch wurden die folgenden vier Extraktionsmittel verglichen:

Petroläther/Amylalkohol im Verhältnis 50:50

Chlorbutan

Chlorbutan/Isopropanol im Verhältnis 85:15

Äther/Äthylacetat

Mit jedem Lösungsmittel wurden zwei Extraktionen durchgeführt:

Der erste Ansatz enthielt opiatfreies Leerblut, um Verschmutzungen aufzudecken.

Beim zweiten Ansatz wurden dem Leerblut 50 ng Morphin und 50 ng Nalorphen pro ml Blut zugegeben.

Die Extraktion verlief in folgenden Schritten:

2 ml Leerblut bzw. Blut mit Morphin und Nalorphen wurden mit Puffer 9,5 auf 20 ml ergänzt und auf die Extrelut^R-Säule gegeben. Nach 30 Min. Einwirkzeit wurden 60 ml des jeweiligen Lösungsmittels auf die Säule geschüttet.

Das Eluat wurde mit 5 ml 0,5 normaler Schwefelsäure ausgeschüttelt und die saure Phase abgenommen. Mit 400 µl Ammoniak wurde der pH auf etwa 9 gepuffert.

Die Rückextraktion erfolgte durch Ausschütteln mit 5 ml Äther/Äthylacetat. Die organische Phase wurde eingedampft und in 50 µl 2%igem PSA gelöst.

Die beste Ausbeute ließ sich mit Chlorbutan und der Petroläther/Amylalkohol-Mischung erzielen.

Mit jedem dieser beiden Lösungsmittel wurden noch einmal drei Extraktionen durchgeführt:

2 ml Blut mit 100 ng Morphin und 100 ng Nalorphin

2 ml Blut mit 1000 ng Morphin und 1000 ng Nalorphin

2 ml einer Urinprobe, die eine unbekannte Menge Morphin enthielt.

Die Petroläther/Amylalkohol-Mischung erwies sich dem Chlorbutan in Ausbeute und Reinheit überlegen.

In einem leicht abgewandelten Extraktionsverfahren wurden noch drei weitere Elutionsmittel mit der Petroläther/Amylalkohol-Mischung verglichen.

Auch hier wurde im ersten Ansatz Leerblut extrahiert.

Im zweiten Ansatz wurden 2 ml Leerblut mit 250 ng Morphin und 250 ng Nalorphin versetzt. Der Unterschied zum Extraktionsverfahren des vorhergehenden Versuchs bestand im Puffer, der auf pH 8,9 eingestellt war und im Rückextraktionsmittel, das auf das jeweilige Extraktionsmittel abgestimmt war.

Zum Vergleich standen folgende Lösungen:

- Chloroform/Isobutanol im Verhältnis 90:10

hier wurde unmittelbar nach der Extraktion in der Säule noch zweimal mit Puffer 10,1 gereinigt. Die Rückextraktion erfolgte mit Äthylacetat/Isopropanol im Verhältnis 90:10

- Toluol/Butanol im Verhältnis 90:10

Rückextraktion mit Äther/Äthylacetat

- Äthylacetat

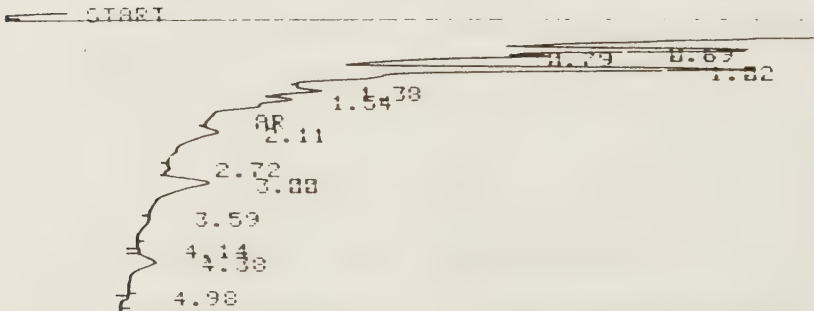
Rückextraktion mit Äthylacetat

- Petroläther/Amylalkohol im Verhältnis 50:50

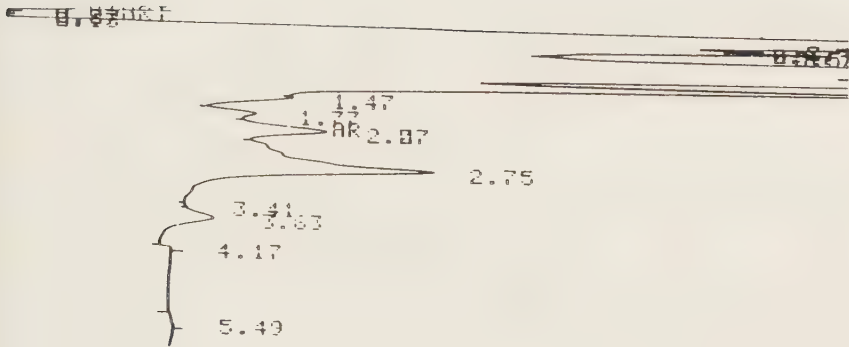
Rückextraktion mit Äther/Äthylacetat

Vergleich verschiedener Extraktionsmittel

Ausbeute bei gleicher Morphin-Konzentration:

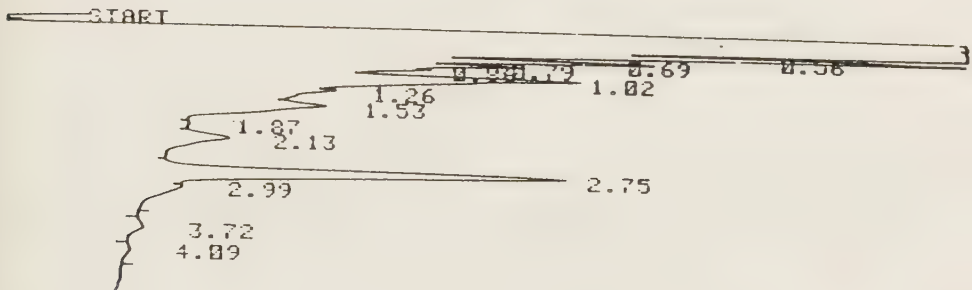


Äther/Äthylacetat; Morphin bei 3.00 Min.



Chlorbutan

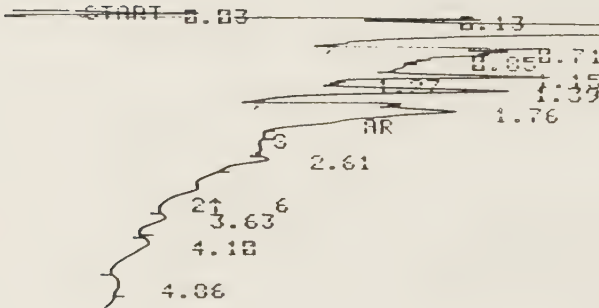
Morphin bei 2.75 Min.



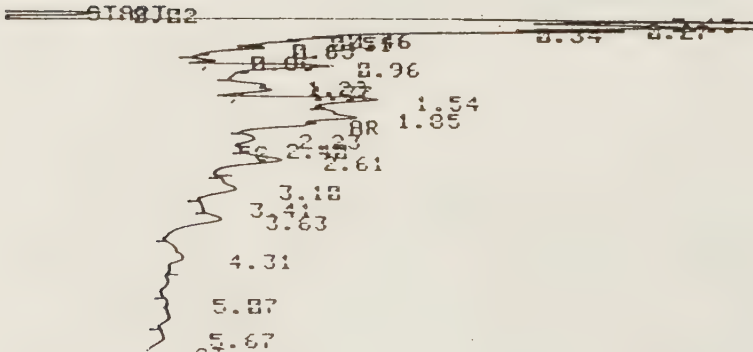
Petroläther 40°C/Isoamylalkohol 50:50

Morphin bei 2.75 Min.

Verunreinigung durch verschiedene Extraktionsmittel in
Extraktionen aus Leerblut:

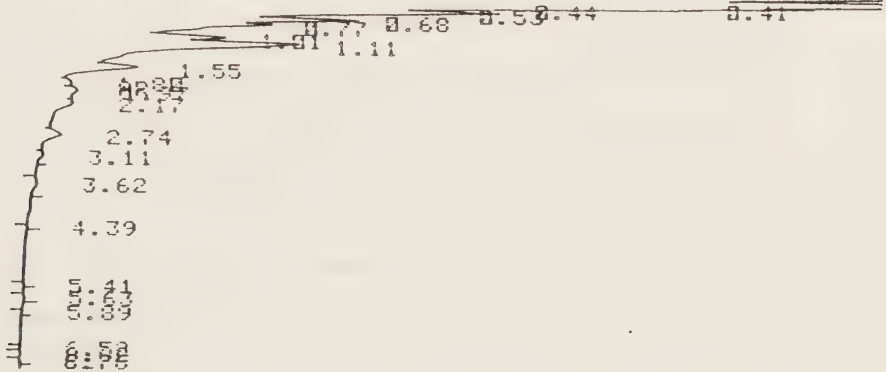


Extraktion mit Toluol/Butanol
Abschwächung 2^6



Extraktion mit Chloroform/Isobutanol, Abschwächung 2^6

START



Extraktion mit Petroläther/Isoamylalkohol, Abschwächung 2⁵

Die geringste Zahl an störenden Begleitsubstraten tritt bei der Extraktion mit Petroläther/Isoamylalkohol auf. In diesem Vergleich bestätigt sich, daß die Petroläther/Amylalkohol-Mischung die größte Ausbeute mit der geringsten Verunreinigung verbindet.

Mischungsverhältnis Petroläther zu Amylalkohol

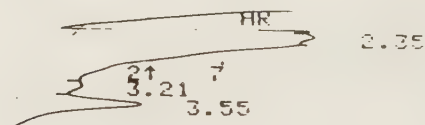
Um das Lösungsmittel endgültig zu optimieren, wurde das Verhältnis von Petroläther zu Amylalkohol variiert. Mischungen im Verhältnis 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 und 90:10 wurden bei gleichbleibender Opiatkonzentration im Blut verglichen.

Die Morphinausbeute nahm im selben Ausmaß ab, wie sich das Verhältnis Petroläther/Amylalkohol zugunsten des Petroläthers verschob. Als optimales Lösungsmittel für die Extraktion über Extrelut^R-Säulen erwies sich demnach die Mischung von Petroläther und Amylalkohol im Verhältnis 50:50.

Der hohe Alkoholanteil ist wegen der starken Polarität des Morphins erforderlich. Die Adsorption der freien Base an der Wand wird durch den Alkohol weitestgehend eingeschränkt.

Auswirkung des veränderten Mischungsverhältnisses von Petroläther zu Amylalkohol:

~~Exp.~~ ~~fe~~ ~~STARI~~

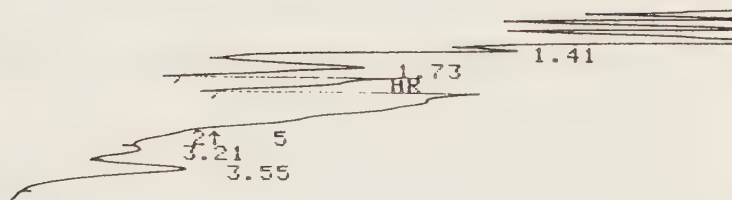


Verhältnis Petroläther/Isoamylalkohol 60:40

Abschwächung 2⁷

Monopropionylmorphin bei 3.55 Min.

START



Verhältnis Petroläther zu Isoamylalkohol 80:20

Abschwächung 2^5

Monopropionylmorphin bei 3.55 Min.

Mit vermindertem Alkoholanteil nimmt die Morphinausbeute ab.

1.4.4. Zusätzliche Reinigungsverfahren

Durch zusätzliche Reinigungsschritte wurde versucht, störende Substanzen noch weiter zu eliminieren.

Das oben beschriebene Extraktionsverfahren wurde um drei Schritte erweitert:

- Unmittelbar nach der Extraktion durch die Extrelut^R-Säule wurden dem Eluat 5 ml Puffer 10,1 zugegeben, damit ausgeschüttelt und der Puffer verworfen.
- Nachdem dem Eluat 5 ml 1 N Schwefelsäure zugesetzt und damit ausgeschüttelt wurde, wird der sauren wäßrigen Phase noch vor dem Puffern 5 ml Äther/Äthylacetat zugefügt, damit aus-

geschüttelt und die organische Phase verworfen. Erst dann wird die saure Phase auf einen pH von ca. 9 gepuffert.
- Die darauf folgende Rückextraktion mit Äthylacetat wird wiederholt

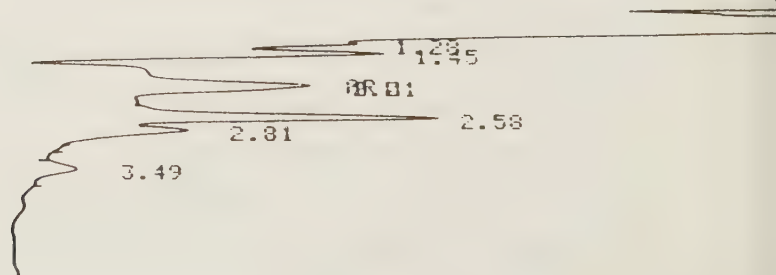
Das zusätzliche Auswaschen mit Puffer 10,1 und Äther/Äthylacetat verbesserte die Reinheit nicht; im Gaschromatogramm verbleiben kleine Verschmutzungs-Peaks, die aber nicht mit Morphin oder Nalorphin interferieren und somit vernachlässigt werden können.

Im endgültigen Extraktionsverfahren empfiehlt sich nur die Wiederholung der Rückextraktion, um die Ausbeute zu optimieren.

Effektivität mehrfacher Reinigung:

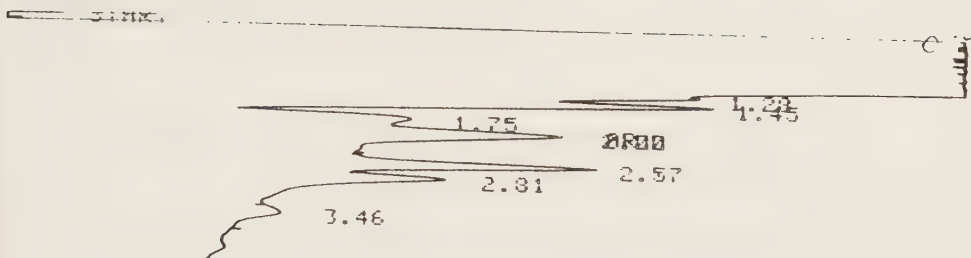
Wiederholtes Ausschütteln mit Äthylacetat kann die Reinheit nicht mehr verbessern:

— CHROM —



Nach 1. maligem Ausschütteln

Morphin bei 2.58 Min., Nalorphin bei 2.81 Min.



Nach 2maligem Ausschütteln

Morphin bei 2.57 Min., Nalorphin bei 2.81 Min.

1.4.5. Bestimmung des günstigsten pH-Wertes

Morphin ist eine amphotere Verbindung. Als organische Base ist es in saurem Milieu stark ionisiert und verbleibt deshalb in der wäßrigen Phase. Zur Extraktion in ein organisches Lösungsmittel ist ein schwach alkalischer pH erforderlich. Er muß für Morphin im Bereich zwischen 8,5 und 9,5 liegen.

Zum Vergleich wurde bei verschiedenen pH-Werten aus diesem Bereich extrahiert. Die besten Ergebnisse gelangen bei pH 8,9. Dieses Resultat deckt sich mit Untersuchungen von Schill, Gustavii und Jönssen (100,101), nach denen Morphin bei pH 8,9 die geringste Ladung trägt.

Der pH wird mit einem Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer auf den Wert von 8,9 eingestellt.

4.1.4.6. Endgültiges Extraktionsverfahren für die Gaschromatographie

Das endgültige Extraktionsverfahren wird folgendermaßen durchgeführt:

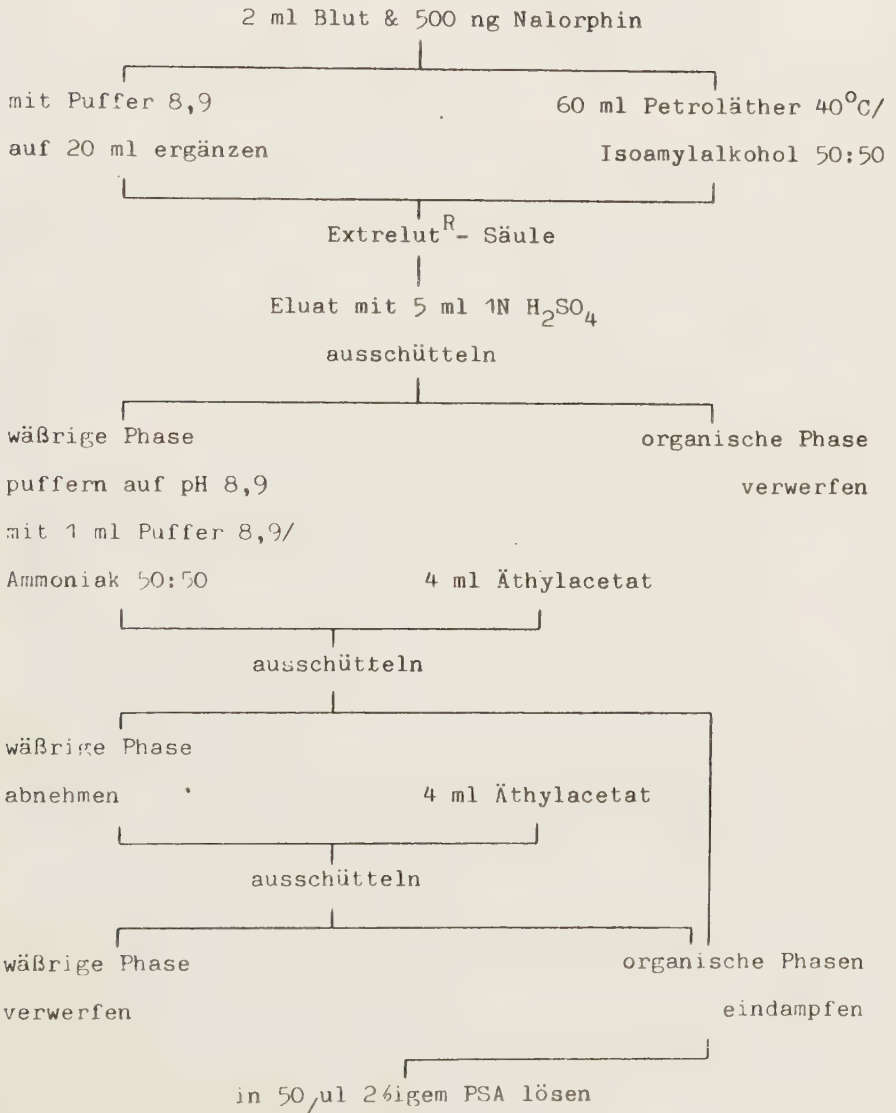
Zu 2 ml Probenblut werden 500 ng Nalorphin (entspricht 250 ng pro ml Blut) als interner Standard hinzugefügt. Mit Ammoniak/Ammoniumchloridpuffer pH 8,9 wird das Blut auf das Volumen von 20 ml ergänzt und auf die Extrelut^R-Säule gegeben.

Nach 30 bis 45 Min. Einwirkzeit wird mit 60 ml Petroläther 40°C/Isoamylalkohol 50:50 eluiert. Das Extraktionsmittel benötigt ca. 60 Min. bis es die Säule vollständig durchlaufen hat. Das gewonnene Eluat wird mit 5 ml einer 1 N H₂SO₄ 60 Sek. ausgeschüttelt und 5 Min. bei 8000 U zentrifugiert. Die wäßrige Phase wird mit 1 ml eines Gemisches aus Ammoniak und dem Puffer 8,9 auf einen pH von ca. 9 eingestellt. Die gepufferte Lösung wird zweimal mit 4 ml Äthylacetat rückextrahiert und die Extrakte eingeeengt.

Der feste Rückstand wird in 50 µl 2%iger PSA-Lösung gelöst und davon 1 µl in den GC eingespritzt.

Die Bildung des Derivates (Monopropionylmorphin) erfolgt im Einspritzblock.

Schema des Extraktionsverfahrens



4.1.5. Eichkurve

Die Eichkurve wurde für den Konzentrationsbereich von 50 ng bis 500 ng Morphin pro ml Blut aufgestellt.

Für die Erstellung der Kalibrationskurve wurden 20 Extraktionen nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt:

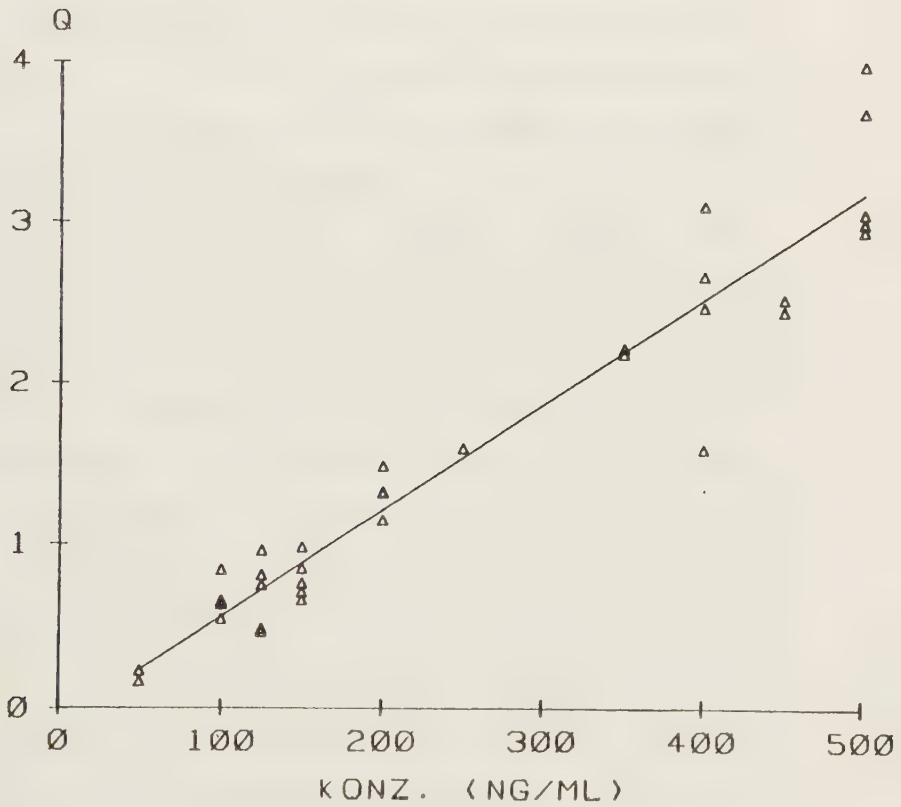
jeweils 2 ml Leerblut wurden mit 100, 200, 250, 300, 400, 500, 700, 800, 900 und 1000 ng Morphin versetzt, entsprechend den Konzentrationen von 50, 100, 125, 150, 200, 250, 350, 400, 450 und 500 ng/ml. Jeder Wert wurde doppelt angesetzt.

Der interne Standard betrug in allen Fällen 500 ng Nalorphin (entsprechend 250 ng/ml).

Die Eichkurve ist im Bereich von 50 - 500 ng/ml linear mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,96. Damit ist der für Untersuchungen relevante Bereich umfaßt; im Blut von Rauschgift-Toten konnten Konzentrationen von 300 - 600 ng Morphin pro ml Blut nachgewiesen werden (79).

Die untere Nachweisgrenze, bei der eine sichere quantitative Angabe möglich ist, liegt bei 50 ng/ml. Um diesen Wert schwanken auch die Nachweisgrenzen anderer Bestimmungsmethoden für Morphin.

Eichkurve für das gaschromatographische Verfahren
gültig im Bereich von 50 bis 500 ng/ml



4.2. EMIT

4.2.1. Funktionsprinzip

EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) ist ein enzym-immunochemisches Verfahren, das auf dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse basiert.

Durch Bindung eines Opiats an Lysozym wird ein enzymmarkierter Metabolit hergestellt. Die markierte Droge koppelt sich an einen spezifischen Antikörper an, wodurch das gebundene Enzym weitestgehend inaktiviert wird. In Gegenwart von freiem Opiat konkurrieren der enzymmarkierte und der freie Wirkstoff um die Bindungsstellen am Antikörper. Das freie Opiat lagert sich an den Bindungsstellen der Antikörper an. Entsprechend ist die Kopplung des markierten Wirkstoffes an die Antikörper behindert und die Inaktivierung des Marker-Enzyms unterbleibt. Das Enzym kann ungehindert sein Substrat umsetzen; die Aktivität wird direkt photometrisch gemessen.

Die Inaktivierung des Marker-Enzyms wird proportional der Konzentration an freiem Opiat verhindert; die Aktivität ist ein direktes Maß für die Opiatkonzentration in der Probe.

Als Substrat dienen Bakterienstämme von *Micrococcus Luteus*, deren Zellwand in einer Lysozym-katalysierten Reak-

tion aufgelöst wird. Die Bakteriensuspension muß entsprechend der Vorschrift mindestens 12 St. vor Gebrauch hergestellt werden.

4.2.2. Anwendungsbereich

Das EMIT-Verfahren wird zum semiquantitativen Nachweis von Drogen im Urin angewandt (97,103).

Für Morphinbestimmungen im Urin wird der Urin ohne vorausgehende Extraktion direkt in die Meßküvette gegeben; nach Zugabe von Puffer, Marker-Enzym und Bakterien-suspension wird die Enzymaktivität photometrisch erfaßt. Sie ist der Opiatkonzentration direkt proportional. Soll EMIT zum Drogennachweis im Blut eingesetzt werden, muß die Probe vor der Messung im Photometer extrahiert werden (118).

Für eine Bestimmung sind 4 ml Blut erforderlich. Sie werden mit 16 ml Ammoniumchlorid/Ammoniak-Puffer pH 9,5 auf 20 ml aufgefüllt und auf Extrelut^R-Säulen gegeben.

Nach 30 Min. Einwirkzeit wird mit 60 ml Äthylacetat eluiert.

Das nach 60 bis 90 Min. gewonnene Eluat wird mit 5 Tropfen methanolischer Salzsäure angesäuert und bei 70°C eingengt.

Der trockene Rückstand wird in 500 μ l H_2O gelöst und kann dann für die EMIT-Bestimmung eingesetzt werden.

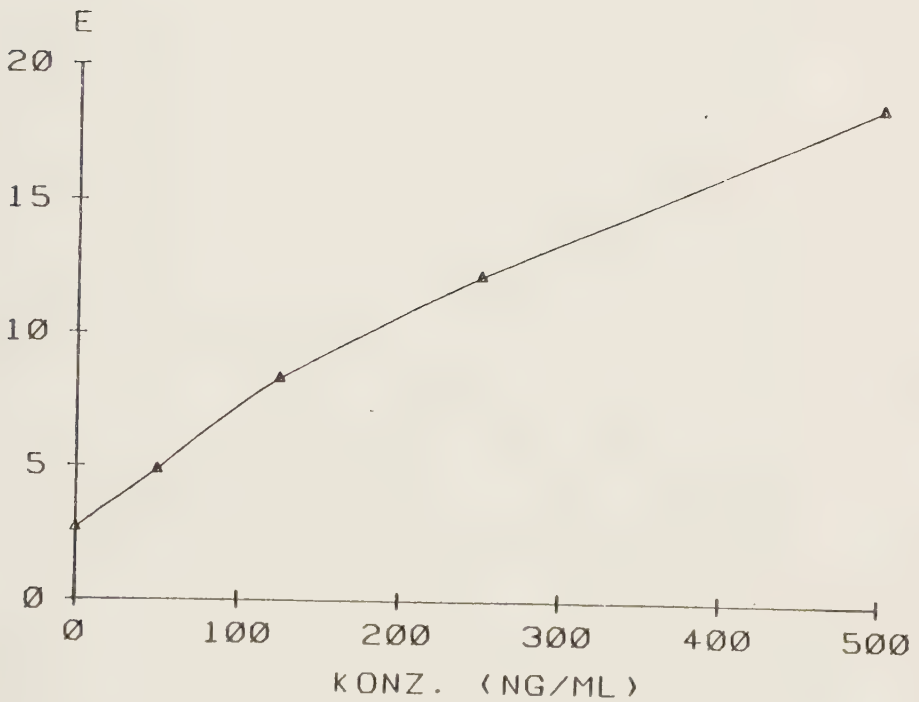
4.2.3. Eichung

Die Eichung muß bei jedem Gebrauch des Gerätes neu erfolgen. Bei exakter Kalibration können Opiate quantitativ bestimmt werden.

Als Kalibratoren dienen Proben von Leerblut oder H_2O , denen vor der Extraktion 20, 50, 100, und 200 μ l Morphin zugesetzt werden, was einer Morphinkonzentration von 50, 125, 250 bzw. 500 ng pro ml Blut entspricht. Zusätzlich wird ein Leerwert gemessen. Zur größeren Genauigkeit wird jeder Wert zwei- bis dreimal angesetzt; außerdem werden die Kalibratoren bei der Messung wiederholt zwischen die zu bestimmenden Proben eingeschoben, um gerätebedingte Schwankungen zu erfassen.

Eichkurve für das EMIT-Verfahren

gültig für den Konzentrationsbereich von 50 bis 500 ng/ml



4.2.4. Fehlerquellen

Die Anwesenheit von endogenem Lysozym in der Probe kann ein falsch positives Resultat vortäuschen. Dieser Fehler kann durch Blindproben, in denen die Antikörper durch Puffer ersetzt sind, eliminiert werden.

Eine weitere Fehlermöglichkeit ist die Verschleppung durch eine stark positive Probe auf die nachfolgende Probe.

EMIT ist eine gruppenspezifische Methode, d.h. sie umfaßt Morphin, Heroin, Codein und synthetische Drogen, wie Hydromorphon (in Dilauid^R) und Oxycodon (in Percodan^R). Bei diesem Verfahren kann also nicht differenziert werden, ob ein positives Resultat auf Rauschmittelzufuhr oder auf die Einnahme eines Medikamentes zurückzuführen ist, das Codein oder ein Morphinderivat enthält.

Bei entsprechend hoher Konzentration kann es bei einer Reihe von Substanzen zu Kreuzreaktionen kommen. Folgende Drogen täuschen den Gehalt von 0,5 mg Morphin pro Liter vor:

Codeinphosphat	0,4 mg/l
Levorphanoltartrat (Dromoran ^R)	2,5 mg/l
Ketobemidone (Cliradon ^R)	50,0 mg/l
Pethidin-Hydrochlorid (Dolantin ^R)	70,0 mg/l
Levallorphanantartrat (Lorfan ^R)	100,0 mg/l
Promethazin-Hydrochlorid (Atosil ^R)	260,0 mg/l
Chlorpromazin-Hydrochlorid (Megaphen ^R)	310,0 mg/l

Triflupromazin-Hydrochlorid (Psyquil^R)

Methadon-Hydrochlorid (1-Polamidon^R)

Normethadon (Ticarda^R)

Dextromoramid (Palfium^R)

(Bei den vier letzten Substanzen sind extrem hohe Konzentrationen nötig, um eine Kreuzreaktion herbeizuführen.)

Diese Angaben entstammen einer Untersuchung von Oellerich, Külpmann und Haeckel (81).

4.3. Vergleich EMIT/GC

In mehreren Untersuchungen wird als zuverlässigstes Verfahren zur quantitativen Morphinanalyse die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrophotometrie (GC/MS) empfohlen (24,74,77,91). Hierzu sind aufwendige Geräte erforderlich, die nur in wenigen Laboratorien zur Verfügung stehen.

Gaschromatographie und EMIT eignen sich ebenfalls gut zur Morphinbestimmung; sie besitzen gegenüber GC/MS den entscheidenden Vorteil, in jedem Labor mit Standard-Ausstattung durchführbar zu sein.

Der Vergleich der Vor- und Nachteile der beiden Methoden zeigt ihre speziellen Einsatzbereiche auf.

4.3.1. Probenmenge

Zur Durchführung des EMIT-Verfahrens sind 4 ml Blut erforderlich, für die Extraktion zur gaschromatographischen Bestimmung genügen 2 ml Blut. In beiden Verfahren wird unbehandeltes Vollblut eingesetzt.

4.3.2. Empfindlichkeit

Die Nachweisgrenzen umfassen bei EMIT und GC denselben Bereich.

Er liegt zwischen 50 und 500 ng/ml. Darunterliegende Werte bis zu 30 ng/ml können gaschromatographisch noch als wahrscheinlich positiv erkannt werden.

Konzentrationen über 500 ng/ml lassen sich quantitativ nicht exakt erfassen, da die Eichkurven von EMIT und GC in diesem Bereich nicht mehr linear sind.

Die Nachweisgrenzen umfassen den für Untersuchungen relevanten Bereich. Blutkonzentrationen über 500 ng/ml sind sehr selten; sie können mit beiden Methoden als eindeutig letale Überdosis erkannt werden.

4.3.3. Präzision

Sowohl enzym-immunochemisch als auch gaschromatographisch wurden für die Morphinkonzentrationen 150 ng/ml und 400 ng/ml je 10 Bestimmungen durchgeführt. Das Morphin wurde dabei wie bei der Kalibration dem Leerblut zugegeben und entsprechend dem jeweiligen Verfahren extrahiert.

Für das EMIT-Verfahren ergaben sich bei diesem Versuch ein Variationskoeffizient von über 20 %, für das GLC-Verfahren ein Variationskoeffizient von 14,8 %.

Beim gaschromatographischen Verfahren errechneten sich folgende Mittelwerte:

Für die Konzentration 150 ng/ml ein Mittelwert von 164 ng/ml aus 10 Extraktionen.

Für die Konzentration 400 ng/ml ein Mittelwert von 393 ng/ml aus 10 Extraktionen.

Die mit EMIT ermittelten Werte waren deutlich ungenauer.

4.3.4. Richtigkeit

Als gruppenspezifisches Verfahren kann EMIT nicht zwischen den verschiedenen Substanzen der Opiat-Gruppe differenzieren. Auch zwischen natürlich vorkommenden Opiat-Alkaloiden und synthetischen Derivaten ist keine Unterscheidung möglich. Außerdem führt eine Reihe zahlreicher Pharmaka, die nicht zu den Opiaten zählen, bei entsprechend hoher Konzentration zu einer Kreuzreaktion und damit zu einem falsch positiven Ergebnis.

Durch die Gaschromatographie werden dagegen die verschiedenen Opiate und verwandte Stoffe genau getrennt. Der Zeitpunkt, zu dem der Morphin-Peak auftritt, läßt sich exakt festlegen. Mit keinem anderen Stoff, auch mit dem nahe verwandten Codein, besteht eine Kreuzreaktion.

Allerdings kann der gesamte Morphin-Bereich im Gaschromatogramm durch eine stickstoffhaltige Substanz überlagert sein. In diesem Fall kann keine Aussage über das Vorhandensein von Morphin gemacht werden. Zum Nachweis muß ein anderes Verfahren herangezogen werden.

4.3.5. Zeit- und Arbeitsaufwand

Die gaschromatographische Messung erfordert eine größere Reinheit der Meßlösung als die immunologisch-photometrische Bestimmung. Daher wird eine Aufarbeitung des Probenblutes für den GC durch zusätzliche Reinigungsschritte kompliziert.

Allerdings ist das hier vorgestellte Extraktionsverfahren gegenüber anderen beschriebenen Verfahren weitestgehend vereinfacht und relativ schnell durchführbar.

Die Differenz im Zeitaufwand gegenüber der Extraktion für die immunologische Bestimmung ist daher nicht gravierend. Sie wird vor allem in der vorletzten Phase der Aufarbeitung, dem Einengen durch Verdampfen, ausgeglichen: für das EMIT-Verfahren müssen circa 60 ml Eluat eingedampft werden, wozu einige Stunden nötig sind. Die zweimal 4 ml Äthylacetat, die für den gaschromatographischen Nachweis eingeengt werden müssen, haben sich dagegen nach ca. 15 Min. verflüchtigt.

Relevanter ist die Zeitdifferenz zwischen EMIT und GC bei der Messung selbst: das Photometer benötigt pro Probe 2 Min., um die Extinktion zu messen und graphisch aufzuzeichnen.

Im Gaschromatographen dauert die Analyse einer Probe 8 Min. Bei dieser Gegenüberstellung muß jedoch berücksichtigt werden, daß beim EMIT-Verfahren für jede Maßreihe die Kalibration neu durchgeführt werden muß. Das bedeutet, daß zusätz-

lich zu den Blutproben 10 bis 15 Kalibrator-Proben extrahiert und mehrmals gemessen werden müssen.

Bei der Gaschromatographie genügt dagegen eine Eichung für jede Trennsäule.

4.4. Gerätebedingungen für die Gas-Flüssigkeits-Chromatographie

Gerät: Hewlett Packard 5840

4 AT Glassäule 2 mm i.D. mit 3% OV 1 BPC auf Chromosorb
WHP 100/120 mesh

Temperaturen:

Einspritzblock 300°C

Ofen 240°C

N-FID-Detektor 300°C

Gase:

25 ml/min. N₂,

3 ml/min. H₂,

60 ml/min. Luft

5. Diskussion

Ein enzym-immunochemisches Verfahren (Enzym Multiplied Immunoassay Technique) und ein gaschromatographisches Verfahren (Gas-Flüssigkeits-Chromatographie) werden hinsichtlich Empfindlichkeit, Präzision, Richtigkeit und Arbeitsaufwand verglichen, um ihre Einsatzfähigkeit für Routine-Bestimmungen zu beurteilen.

Der Vergleich zeigt, daß beide Methoden bezüglich ihrer Empfindlichkeit gleichwertig sind; bezüglich Präzision und Richtigkeit ist das gaschromatographische Verfahren eindeutig überlegen.

Im Gegensatz zum gruppenspezifischen EMIT kommt es beim gaschromatographischen Nachweis von Morphin zu keiner Kreuzreaktion mit anderen Substanzen aus der Opiatgruppe. Ein positiver Ausschlag im Gaschromatogramm zu dem für Morphin spezifischen Zeitpunkt ist mit allergrößter Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit von Morphin beweisend; ein positives Ergebnis im EMIT kann dagegen durch verschiedene Pharmaka bedingt sein.

Der Variationskoeffizient von 14,8 % weist das GC-Verfahren als eindeutig präziser aus als das EMIT-Verfahren mit dem Variationskoeffizienten von über 20 %.

Die enzym-immunochemische Methode, die ursprünglich für semiquantitative Nachweise im Urin entwickelt wurde, ermöglicht

bei genauer Eichung auch eine quantitative Bestimmung der Morphin-Konzentration im Blut. Ihr entscheidender Vorteil liegt in der einfachen Aufarbeitung des Probenblutes und der äußerst schnellen Messung durch das Photometer.

Dieser Vorteil kommt jedoch nur bei einer größeren Anzahl an Blutproben zum Tragen, für die die Durchführung einer Kalibration rentabel ist. Bei einer geringen Zahl von Proben wäre es unrationell, eine eigene Eichkurve aufzustellen. Einzelne Proben werden deshalb immer günstiger gaschromatographisch untersucht.

Die Bestimmung mittels Gaschromatographie ist auch dann vorzuziehen, wenn zur Analyse nur sehr wenig Blut zur Verfügung steht. Während für EMIT 4 ml Blut erforderlich sind, genügen zur Aufarbeitung für den GC 2 ml bei gleicher Empfindlichkeit. Dadurch wird bei einer etwas größeren Blutmenge auch eine mehrfache Bestimmung möglich, die das Ergebnis zusätzlich sichert.

Ein wesentlicher Nachteil des gaschromatographischen Verfahrens liegt in seiner Anfälligkeit gegenüber Störsubstanzen. N-haltige Stoffe führen im Gaschromatogramm zu Interferenzen mit Morphin; Blutproben, die u.a. N-haltige Substanzen enthalten, können deshalb nicht gaschromatographisch untersucht werden. Der Morphinnachweis kann in diesen Fällen nur durch ein anderes Verfahren erbracht werden. (Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit gelang es am Institut für

Rechtsmedizin, München, mit einer Weiterentwicklung des hier beschriebenen Verfahrens, das Problem der Interferenzen zu umgehen: das Morphin wird nicht mehr in sein Monopropionylderivat überführt, sondern in das Dipropionylderivat. Der entsprechende Peak erscheint im Gaschromatogramm erst einige Minuten später als die N-haltigen Störsubstanzen, so daß eine Überlagerung weitgehend vermieden wird. Ein zusätzlicher Fortschritt des neuen Verfahrens gelang mit der weiteren Verringerung der eingesetzten Blutmenge auf 0,5 ml.)

Bei Vergleichen der bekannten Nachweismethoden für Morphin wurde wiederholt als Optimum die Kombination von zwei Verfahren empfohlen.

Mit EMIT und GC stehen Methoden zur Verfügung, die in jedem forensischen Labor mit vorhandener Ausrüstung einfach und schnell durchzuführen sind, und die sich ideal ergänzen. Der EMIT-Test eignet sich als unkompliziertes Screening-Verfahren; bei einem negativen Ergebnis kann Morphin im Probenblut ausgeschlossen werden. Ein positives Resultat im EMIT läßt zwar eine hinreichend genaue quantitative Angabe zu, ist aber hinsichtlich seiner Richtigkeit nicht verläßlich.

Positive oder zweifelhafte EMIT-Resultate sollten daher mit dem GC-Verfahren verifiziert werden. Erst durch das Gaschromatogramm kann ausgeschlossen werden, daß das positive

Ergebnis auf eine Kreuzreaktion mit anderen Pharmaka zurückzuführen ist. Außerdem kann die Morphinkonzentration gaschromatographisch noch wesentlich präziser bestimmt werden.

Die Kombination von EMIT und GC gewährleistet einen leicht praktikablen, zuverlässigen Morphinnachweis im Blut und eine unkomplizierte, präzise Konzentrationsbestimmung.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden ein indirektes enzym-immunochemisches und ein gaschromatographisches Verfahren zum quantitativen Morphinnachweis im Blut gegenübergestellt.

Für das gaschromatographische Verfahren wurde eine einfache und relativ schnelle Aufarbeitung des Probenblutes entwickelt. Die Extraktion über Extrelut^R-Säulen mit einem Petroläther 40^OC/Isoamylalkohol-Gemisch als Elutionsmittel verbindet einfache Durchführung mit hoher Ausbeute. Das extrahierte Morphin wird in der Säule fast vollständig zum Monopropionyl-Derivat acyliert; als Derivatisierungsreagenz dient 2%ige Propionsäureanhydrid-Lösung.

Im Vergleich mit EMIT erweist sich das GC-Verfahren hinsichtlich der Empfindlichkeit als gleichwertig, hinsichtlich Präzision und Richtigkeit als eindeutig überlegen. Der Vorteil der EMIT-Methode liegt in der einfacheren Aufarbeitung der Blutprobe und der schnelleren Messung im Photometer.

Für die Morphin-Bestimmung im forensischen Labor empfiehlt sich die Kombination der beiden Verfahren: mit dem EMIT-Test steht eine leicht praktikable Screening-Methode zur Verfügung, mit der eine größere Anzahl an Blutproben schnell

auf das Vorhandensein von Opiaten hin untersucht werden kann. Auch eine Konzentrationsangabe ist möglich, mit einer Abweichung bis über 20% vom tatsächlichen Wert muß allerdings gerechnet werden.

Positive oder zweifelhafte Ergebnisse werden gaschromatographisch nachuntersucht und quantitativ exakt bestimmt. Richtige Ergebnisse können so bestätigt und falsch positive Resultate eliminiert werden.

Mit der Kombination von EMIT und GC gelingt in jedem forensischen Laboratorium vorhandener Ausstattung ein zuverlässiger quantitativer Nachweis von Morphin im Blut.

Literaturverzeichnis

- 1) Adler F.L. und Lin C.T.:

Detection of morphine by hemagglutination inhibition
J. Immunol. 106:1684 (1971)

- 2) Adler F.L., Lin C.T. und Catlin D.H.:

Immunological studies on heroin addiction I: methodology
and application of hemagglutination inhibition test
for detection of morphine
Clin. Immun. 1:53 (1972)

- 3) Alder T.K.:

A newly identified metabolic product of codeine: N-demethylated codeine
J. Pharmacol. exp. Ther. 106:371 (1952)

- 4) Anders M.W. and Mannering G.J.:

New peak shift technique for gas-liquid chromatography.
Preparation of derivatives on the column.
Anal. Chem. 34:731 (1962)

- 5) Anders M.W. und Mannering G.J.:

in A. Stolman (Herausgeber): Progress in chemical toxicology Vol. 3, Academic Press, London, New York (1967)

- 6) Baselt R.C., Allison D.J., Wright J.A., Scannel J.R. und Stephens B.G.:
Acute heroin fatalities in San Franzisko
West J. Med. 122:455 (1975)
- 7) Bayse D. und Lewis D.S.:
Drug abuse, survey II: amphetamine - barbiturate - methadone - morphine
Department of health, education and welfare, Atlanta (1972)
- 8) Berkowitz B.A., Ngai S.H., Yang J.C., Hempstead J. und Spector S.:
The disposition of morphine in surgical patients
Clin. Pharmacol. Ther. 17/6: 629 (1975)
- 9) Blake J.W., Hoffman R., Norman J. und Ray R.:
American Laboratory, p.63 (1973)
- 10) Boerner U., Abbot S. und Roe R.L.:
The metabolism of morphine and heroin in man
Drug. Metab. Rev. 4:39 (1975)
- 11) Bohn G., Schulte E. und Audick W.:
Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchung an im Münsterland in den Jahren 72 bis 76 sichergestellten Heroinproben
Arch. Kriminol. 160:27

- 12) Breiter J., Helger R. und Lang H.:

Evaluation of column extraction: a new procedure for the analysis of drugs in body fluids

For. Sci. 7:131 (1976)

- 13) Brochmann-Hanssen E. und Svendsen A.B.:

Gas-chromatography of alkaloids, alkaloidal salts and derivatives

J. pharm. Sci. 51:1095 (1962)

- 14) Brochmann-Hanssen E. und Svendsen A.B.:

Quantitative determination of morphine in opium by gas-liquid chromatography

J. pharm. Sci. 52:1134 (1963)

- 15) Brochmann-Hanssen E. und Oke T.O.:

J. pharm. Sci. 58:371 (1969)

- 16) Broughton A. und Ross D.L.:

Drug screening by enzymatic immunoassay with the centrifugal analyzer

Clin. Chem. 21/2:186 (1975)

- 17) Brugaard G. und Rasmussen K.E.:

Quantitative gas-liquid chromatography of amphetamine, ephedrine codeine and morphine after on-column acylation

J. Chromat. 147:476 (1978)

- 18) Brunk S.F. und Delle M.:
Morphine metabolism in man
Clin. Pharmacol. Ther. 1/1:51 (1974)
- 19) Cashman P.J. und Thornton J.I.:
High speed liquid adsorption chromatography in criminalistics. The separation of heroin, O⁶-monoacetylmorphine and morphine
J. forens. Sci. Soc. 12:417 (1972)
- 20) Catlin D.H.:
Amer. J. Clin. Pathol. 60:720 (1973)
- 21) Catlin D.H., Cleeland R. und Grunberg E.:
A sensitive, rapid radioimmunoassay for morphine, and immunologically related substances in urine and serum
Clin. Chem. 19:216 (1973)
- 22) Chan M.L., Whetsell C. und McChesney J.D.:
Use of high pressure liquid chromatography for the separation of drugs of abuse
J. Chrom. Sci. 12:512 (1974)
- 23) Christopoulos G.N. und Kirch E.R.:
Isolation and identification of morphine from post mortem tissues
J. chromat. 65:507 (1972)

24) Clark C.C.:

A study of procedures for the identification of heroin
J. forens Sci., p.424 (1976)

25) Cleeland R., Christenson J., Usategui-Gomez M.,
Heveran J., Davis R. und Grünberg E.:

Detection of drugs of abuse by RIA: summary of published
data and some new information
Clin. Chem. 22:712 (1976)

26) Curry A.S. und Patterson D.A.:

J. Pharm. Pharmacol. 22:198 (1970)

27) Dahlström B., Bolme P., Feychting H., Noack G. und
Paalzow L.:

Morphine kinetics in children
Clin. Pharmacol. Ther. 26/3:354 (1979)

28) Dahlström B. und Paalzow L.:

Quantitative determination of morphine in biological
samples by gas-liquid chromatography an electron
capture detection
J. Pharm. Pharmacol. 27:172 (1975)

29) Dahlström B., Paalzow L. und Edlund P.O.:

Simultaneous determination of codeine and morphine in

biological samples by gas chromatography with electron capture detection

Acta Pharmacol. 41:273 (1977)

- 30) Dawidow B., Petri N. und Quame B.:

Thin-layer chromatographic screening procedure for detecting drug abuse

Amer. J. clin. Pathol. 50:714 (1968)

- 31) DeZan P. und Fasanello J.:

The quantitative determination of heroin in illicit preparations by gas chromatography

J. chrom.Sci. 10:333 (1972)

- 32) Ebbighausen W.O.R., Mowat J.H., Vestergaard P. und Kline N.S.:

Stable isotope method for the assay of codeine and morphine by gas chromatography mass spectrometry. A feasibility study

- 33) Elison C. und Elliott H.W.:

J. Pharmacol. exp. Ther. 144:265 (1964)

- 34) Elliott H.W., Parker K.D., Wright J.A. und Nomoff N.:

Actions and metabolism of heroin administered by continuous infusion to man

Clin. Pharmacol. Ther. 12:806 (1971)

- 35) Felby S., Christensen H. und Lund A.:

Morphine concentrations in blood and organs in cases
of fatal poisoning

For. Sci. 3:77 (1974)

- 36) Felby S.:

Morphine: its quantitative determination in nanogram
amounts in small samples of whole blood by electron
capture gas chromatography

For. Sci. 13:145 (1979)

- 37) Finkle B. und Taylor D.M.:

J. chrom. Sci. 10:312 (1972)

- 38) Fish F. und Hayes T.S.:

Hydrolysis of morphine glucuronide

J. forens. Sci. p. 676 (1973)

- 39) Fish F. und Wilson W.D.C.:

Gas chromatic determination of morphine and cocaine in
urine

J. chromat. 40:164 (1969)

- 40) Fraser H.F., Isbell H. und Van Horn G.D.:

Human pharmacology and addiction hability of norcodeine

J. Pharmacol. exp. Ther. 29:172 (1960)

- 41) Fujimoto J. und Way E.L.:
J. Pharmacol. exp. Ther. 165:45 (1957)
- 42) Garnot J.C. und Sturner W.Q.:
Morphine concentrations and survival periods in acute
heroin fatalities
New Engl. J. Med. 238:1276 (1973)
- 43) Garrett E.R. und Gürkan T.:
Pharmacokinetics of morphine and its surrogates I:
comparisons of sensitive assays of morphine in biological
fluids and application to morphine pharmacokinetics in
the dog
J. pharm. Sci. 67/11:1512 (1978)
- 44) Garrett E.R. und Gürkan T.:
Pharmacokinetics of morphine and its surrogates II:
Methods of separation of stabilized heroin and its
metabolites from hydrolyzing biological fluids and
applications to protein binding and red blood cell
partition studies
J. pharm. Sci. 68/1:26 (1979)
- 45) Gelbke H.P. und Bösche J.:
Radioimmunologischer Nachweis von Morphin im Hämatom-
blut bei einem um 1 1/2 Tage überlebten Unfall
Arch. Kriminol. 159:31

- 46) Goldbaum R.L., Santinga P.H. und Dominguez A.M.:

A procedure for rapid analysis of large numbers of urine samples for drugs

Clin. Tox. 5:367 (1972)

- 47) Gorodetzky C.W. und Kullberg M.P.:

Validity of screening methods for drugs of abuse in biological fluids

Clin. Pharmacol. Ther. 15/6:579 (1974)

- 48) Hanson A. und Lindgren J.-E.:

Analysis of "morphine base"

Arch. Toxicol. 31:1 (1973)

- 49) Helpern M.:

Fatalities from narcotic addiction in New York City
Incidence, circumstances and pathologic findings

Hum. Path. 3:13 (1972)

- 50) Hipp P.P., Eveland M.R., Meyer E.R., Sherman W.R. und Cicero T.J.:

Mass fragmentography of morphine: relationship between brain levels and analgesic activity

J. Pharmacol. exp. Ther. 196:642 (1976)

- 51) Ho I.K., Loh H.H. und Way E.L.:

J. Chromat. 65:577 (1972)

- 52) Huffman D.A. und Ferguson R.L.:

Acute codeine overdose: correspondence between clinical course and codeine metabolism

Johns Hopk. Med. J. 136:183 (1975)

- 53) Ikekawa N., Takayama K., Hosoya E. und Oka T.:

Determination of morphine in urine by gas chromatography

Analyt. Biochem. 28:156 (1969)

- 54) Jain N.C. und Kirk P.L.:

Systematic applications of gas-liquid chromatography in toxicology:

I. Extraction procedure and the alkaloids

Microchem. J. 12:229 (1967)

- 55) Jane J.:

The separation of a wide range of drugs of abuse by high-pressure liquid chromatography

J. Chromat. 111:227 (1975)

- 56) Johnson E.H., Goldbaum R.L. und Whelton R.L.:

Investigation of sudden deaths in addicts

Med. Sci. Law 11:135 (1971)

- 57) Klebe F.J., Finkbeiner H. und White D.M.:

Silylation with bis(trimethylsilyl)acetamide, a highly

reactive silyl donor

J. Amer. chem. Soc. 80:3390 (1966)

- 58) Kogan M.J. und Chedekel M.A.:

Rapid g.l.c. method for the separation of picogram quantities of morphine and codeine

J. Pharm. Pharmacol. 28:261 (1976)

- 59) Kupferberg H., Burkhalter A. und Way E.L.:

A sensitive fluorometric assay for morphine in plasma and brain

J. Pharmacol. exp. Ther. 145:247 (1964)

- 60) Kuschinsky G. und Lüllmann H.:

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1976

- 61) Leute R.K., Ullman E.F. und Goldstein A.:

Spin immunoassay techniques of opiate narcotics in urine and saliva

Jama 221:1231 (1972)

- 62) Leute R.K., Ullman E.F., Goldstein A. und Herzenberg A.:

Spin immunoassay technique for determination of morphine

Nature 236:93 (1972)

63) Liras P.:

Thin-layer and gaschromatographic parameters of morphine
and codeine derivatives

J. Chromat. 106:238 (1975)

64) Loh, H.H., Ho I.K., Cho T.M. und Lipscomb W.:

J. Chromat. 76:505 (1973)

65) Martin A.J.P. und James A.P.:

Gas-liquid partition chromatography: the separation and
micro-estimation of volatile fatty acids from formic
acid to dodecanoic acid

Biochem. J. 50:679 (1952)

66) Martin G.E. und Swinehart J.S.:

Use of silyl derivatives in the quantitative gas chromato-
graphic determination of morphine and codeine

Anal. Chem. 38: 1789 (1966)

67) Mellet L.B. und Woods L.A.:

The distribution and fate of morphine in the non-
tolerant and tolerant monkey

J. Pharmacol. exp. Ther. 116: 77 (1956)

68) V.Meyer L. und Kauert G.:

Zum gaschromatographischen Nachweis von Morphin im bio-
logischen Material

Vortrag Treffen Süddeutscher Rechtsmediziner St. Gallen
(1978)

- 69) V. Meyer L., Drasch G. und Kauert G.:

Zur quantitativen Morphinbestimmung im Blut mittels
Enzymimmunoanalyse

Beitr. Gerichtl. Med. 38:63 (1980)

- 70) Milne M.D., Scribner B.H. und Crawford M.A.:

Non-ionic diffusion and the excretion of weak acids and
bases

Am. J. Med. 24:709 (1958)

- 71) Moore J.M.:

Rapid and sensitive gas chromatographic quantitation
of morphine, codein and o⁶-acetylmorphine in illicit
heroin using an electron capture detector

J. Chromat. 147:327 (1978)

- 72) Moore J.M. und Bena F.E.:

Rapid gas chromatographic assay for heroin in illicit
preparations

Anal. Chem. 44:385 (1972)

- 73) Mulé S.J.:

Determination of narcotic analgesics in human biological
materials; application of UV-spectrophotometry, thin-

layer and gas-liquid chromatography

Anal. Chem. 36:1907 (1964)

74) Mulé, S.J.:

Methods for the analysis of morphine and related surrogates: current status

J. chrom. Sci. 12:245 (1974)

75) Mulé, S.J. und Hushin P.L.:

Anal. Chem. 43:708 (1971)

76) Nakamura G.R. und Meuron H.J.:

Anal. Chem. 41:1124 (1969)

77) Nakamura G.R., Noguchi T.T., Jackson D. und Banks D.:

Forensic identification of heroin in illicit preparations using integrated gas chromatography and mass spectrometry

Anal. Chem. 44:408 (1972)

78) Nakamura G.R. und Way E.L.:

Determination of morphine and codeine in post-mortem specimens

Anal. Chem. 47:775 (1975)

79) Nakamura G.R.:

Toxicologic assessments in acute heroin fatalities

Clin. Tox. 13:75 (1978)

- 80) Oellerich M. und Haeckel R.:

Einsatz von Enzymimmunoassays beim Drogenscreening

Lab. med. 65 (1979)

- 81) Oellerich M., Külpmann W.R. und Haeckel R.:

Drug screening by enzyme immunoassay (EMIT) and thin-layer chromatography (Drug screen)

J. clin. Chem. clin. Biochem. 15:175 (1977)

- 82) Oldendorf W.H., Hyman S., Braun L. e.a.:

Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin and methadone after carotid injection

Science 178:948 (1972)

- 83) Olieman C., Maat L., Waliszewsky K. und Beyermann H.C.:

Chemistry of opium alkaloids, VIII. Separation of opium alkaloids and related compounds by ion-pair high performance liquid chromatography

J. Chromat. 133:382 (1977)

- 84) Parke D.V.:

in "The Biochemistry of Foreign Compounds"

Pergamon Press London, p. 193 (1968)

- 85) Parker K.D., Wright J.A., Halpern A.F. und Hine C.H.:

J. forens. Sci. Soc. 10:17 (1970)

- 86) Payte J.T., Wallace J.E. und Blum K.:

Hydrolysis: a requisite for morphine detection in urine
Cur. ther. Res. 13:412 (1971)

- 87) Pearson M.A., Poklis A. und Morrison R.R.:

A fatality due to the ingestion of (methyl morphine)
codeine
Clin. Tox. 15:267 (1979)

- 88) Peat M.A. und Sengupta A.:

Toxicological investigations of cases of death involving
codeine and dihydrocodeine
For. Sci. 9:21 (1977)

- 89) Püschel K., Schulz F., Naeve W. und Arnold W.:

Todesfälle nach nasaler Applikation von Heroin
Z. Rechtsmed. 84:279 (1980)

- 90) Rasmussen K.E.:

Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chro-
matography and on-column silylation
J. Chromat. 120:491 (1976)

- 91) Reed D.:

Comparison of spectrofluorometric and gc/ms procedures
for the quantitation of morphine in blood and brain
Clin. Tox. 14/2:169 (1979)

- 92) Reed D., Spiehler V.R. und Cravey R.H.:

Two cases of heroin-related suicide

For. Sci. 9:49 (1977)

- 93) Reuland D.J. und Trinler W.A.:

An equivocal determination of heroin in simulated street drugs by a combination of high-performance liquid chromatography and infrared spectrophotometry using micro-sampling techniques

For. Sci. 11:195 (1978)

- 94) Reynolds P.C.:

Morphine free in blood, urine and tissue; morphine total in bile

Traces 10:1 (1972)

- 95) Richards e.a.:

Death from intravenously administered narcotics: a study of 114 cases

J. forens. Sci. 21:467 (1976)

- 96) Robinson A.E. und Williams F.M.:

Post-mortem distribution of morphine in heroin addicts

Med. Sci. Law 11:135 (1971)

- 97) Rubenstein K.E., Schneider R.S. und Ullman E.F.:

"Homogenous" enzyme immunoassay. A new immunochemical

technique

Biochem. Biophys. Res. Comm. 47:846 (1972)

98) Saferstein R. und Chao J.:

J. Ass. Offic. Anal. Chem. 56:1234 (1973)

99) Sansur M., Buccafuri A. und Morgenstern S.:

J. Ass. Offic. Anal. Chem. 55:880 (1972)

100) Schill G. und Gustavii K.:

Act. pharm. s. 1:24 (1964)

101) Schill G. und Jönsson T.E.:

Act. pharm. s. 1:13 (1964)

102) Schmerzler E., Yu W., Hewitt M. und Greenblatt I.J.:

Gas chromatographic determination of codeine in serum
and urine

J. pharm. Sci. 55:155 (1966)

103) Schneider R.S., Lindquist P., Tong-in Wong E., Ruben-
stein K.E. und Ullman E.F.:

Homogenous immunoassays for opiates in urine

Clin. Chem. 19:821 (1973)

104) Seed J.C., Wallenstein S.L., Houde R.W. und Belville J.W.

A comparison of the analgesic and respiratory effects

of dihydrocodeine and morphine in man
Arch. int. Pharmacodyn. 116:293 (1958)

105) Serfontein W.J., Botha D. und De Villiers L.:

A rapid g.l.c. procedure for the determination of codeine
and norcodeine in biological fluids based on micro-
phase extraction technique
J. Pharm. Pharmacol. 27:937 (1975)

106) Siek T.J.:

Toxicol. News1. 2:3 (1975)

107) Slightom E.L.:

The analysis of drugs in blood, bile and tissue with
an indirect homogenous enzyme immunoassay
J. forens. Sci. p. 292

108) Smith D.A. und Cole W.J.:

Rapid and sensitive gas chromatographic determination
of diacetylmorphine and its metabolite monoacetylmorphine
in blood using a nitrogen detector
J. Chromat. 105:377 (1975)

109) Sohn D. und Simon J.:

Clin. Chem. 18:405 (1972)

- 110) Sohn D., Simon J., Hanna M.A., Ghali G.V., Tolba R.A.
und Melkonian V.:
Screening for heroin - a comparison of current methods
Anal. Chem. 45:1495 (1973)
- 111) Solomon M.D.:
A study of codeine metabolism
Clin. Tox. 7:255 (1974)
- 112) Soni S.K. und Dugar S.M.:
Separation of standard opiates and their analysis in
pharmaceutical and illicit preparations by paired-ion
reverse-phase high-pressure liquid chromatography
J. forens. Sci. p. 437 (1978)
- 113) Spector S. und Parker C.W.:
Morphine radio immunoassay
Science 168:1374 (1970)
- 114) Spector S.:
Quantitative determination of morphine in serum by radio
immunoassay
J. Pharmacol. exp. Ther. 178:253 (1971)
- 115) Stahl E.:
Thin-layer chromatography - a laboratory handbook
Springer Verlag New York (1969)

116) Street H.V.:

Gaschromatographie von Submikrogramm-Mengen von Drogen;

III. Alkaloide in biologischem Material

J. Chromat. 29:68 (1967)

117) Street H.V.:

J. Chromat. 41:358 (1968)

118) Stumpf C.:

Untersuchung zur Morphinbestimmung im Blut mittels EMIT

Dissertationsarbeit, Inst. f. Rechtsmed. München (1981)

119) Takemori A.E.:

An ultrasensitive method for the determination of morphine and its application in experiments in vitro and in vivo

Biochem. Pharmacol. 17:1627 (1968)

120) Trinler W.A. und Reuland D.J.:

Rapid screening of street drugs by high-pressure liquid chromatography: the screening of cocaine, heroin, methadone and morphine by reverse phase HPLC

J. forens. Sci. Soc. 15:153 (1975)

121) Ulrich L. und Rügsegger P.:

Bestimmung von Morphin und Codein im Urin mit Hilfe der

Hochdruckflüssigchromatographie

Arch. Toxicol. 45:241 (1980)

- 122) Viala A. und Estadieu M.:

J. Chromat. 72:127 (1972)

- 123) Wallace J.E., Biggs J.D. und Blum K.:

Gas-liquid and thin-layer chromatographic determination
of morphine in biologic specimens

Clin. Chim. Acta 36:85 (1972)

- 124) Wallace J.E., Hamilton H.E., Blum K. und Petty C.:

Determination of morphine in biologic fluids by electron-
capture gas-liquid chromatography

Anal. Chem. 46:2107 (1974)

- 125) Way E.L. und Adler T.K.:

The pharmacologic implications of the fate of morphine
and its surrogates

Pharmacol. Rev. 2:383 (1960)

- 126) Way E.L. und Adler T.K.:

The biological disposition of morphine and its surrogates

Bull. WHO 26:51 (1962)

- 127) Way E.L., Kemp J.W., Young J.M. und Grassetti D.R.:

The pharmacologic effects of heroin in relationship to

its rate of biotransformation

J. Pharmacol. exp. Ther. 129:144 (1960)

- 128) Way E.L., Young J.M. und Kemp J.W.:

Metabolism of heroin and its pharmacological implications

Bull. Narcot. 17:25 (1965)

- 129) Wheals B.B.:

Forensic aspects of high pressure liquid chromatography

J. Chromat. 122:85 (1976)

- 130) Wilkinson G.R. und Way E.L.:

Submicrogram estimation of morphine in biological fluid
by gas-liquid chromatography

Biochem. Pharmacol. 18:1435 (1969)

- 131) Winek C.L., Collom W.D. und Wecht C.H.:

Codeine fatality from cough syrup

Clin. Tox. 3:97 (1970).

- 132) Woods L.A.:

Distribution and fate of morphine in non-tolerant and
tolerant dogs and rats

J. Pharmacol. exp. Ther. 112:158 (1954)

- 133) Wright C.J.:

J. Pharmacol. exp. Ther. 71:164 (1947)

- 134) Wright J.A., Baselt R.C. und Hine C.A.:

Blood codeine concentration in fatalities associated
with codeine

Clin. Tox. 8:457 (1975)

- 135) Wu C.Y. und Wittick J.J.:

Separation of five major alkaloids in gum opium and
quantitation of morphine, codeine and thebaine by
isocratic reverse phase high performance liquid chroma-
tography

Anal. Chem. 49:359 (1977)

- 136) Yeh S.Y.:

Isolation and identification of morphine ethereal sul-
fate, normorphine and normorphine conjugate as morphine
metabolites in man

Fed. Proc. 32:736 (1973)

- 137) Yeh S.Y.:

Separation and identification of morphine and its meta-
bolites and congeners

J. pharm. Sci. 62:1827 (1973)

- 138) Yeh S.Y. und Woods A.:

Determination of radioactive labeled codeine, morphine,
dihydromorphine and their metabolites in biological ma-

terials

J. pharm. Sci. 59:380 (1970)

- 139) Ziegler H.W., Beasley T.H. und Smith D.W.:

Simultaneous assay for six alkaloids in opium using high performance liquid chromatography

J. Ass. Offic. Anal. Chem. 58:888 (1975)

- 140) Zumwalt R.W., Stalling D.L. und Gehrke C.W.:

A new silylation reagent: bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

Mtg. Am. Chem. Soc. 154:159 (1967)

- 141) Zweidinger R.A., Weinberg F.M. und Handy R.W.:

Quantitative g.l.c. determination of codeine in plasma

J. pharm. Sci. 65/3:427 (1976)

Dank

Nach Fertigstellung der vorliegenden Dissertationsschrift möchte ich allen danken, die das Zustandekommen der Arbeit ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Spann für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor des Instituts für Rechtsmedizin.

Herrn Dr. Ludwig von Meyer danke ich sehr herzlich für die freundliche und hilfreiche Betreuung während der experimentellen Arbeit und die korrektive Unterstützung bei der Ausarbeitung.

Bei Herrn Dr. Erich Schuller bedanke ich mich für seine Hilfe bei der maschinellen Erstellung der Eichkurven.

Allen Mitarbeitern am Institut für Rechtsmedizin danke ich für die Bereitschaft zur Zusammenarbeit in kollegialer Atmosphäre.

Lebenslauf

Geboren: 05.06.1957 in Landshut

Eltern: Walter Pfaffenzeller, Oberstudiendirektor
und Marga Pfaffenzeller, geb. Schütz

Geschwister: Reiner und Oliver Pfaffenzeller, geb. 1966

Heirat: 1983 mit Fritz Merk, Dipl.-Betriebswirt,
Landshut

Ausbildung: 1963 - 1967 Grundschule Seligenthal in
Landshut
1967 - 1976 Hans Carossa-Gymnasium in
Landshut
Neusprachlicher Zweig des
Humanistischen Gymnasiums
Abschluß: Abitur
1976 - 1983 Ludwig Maximilians-Universität
in München
Studium der Humanmedizin

